

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE FARMACIA**



**TESIS DOCTORAL**

**Efectos del etanol y acetaldehído sobre el metabolismo  
glucídico y lipídico en hígado de rata**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Carmen Cascales Angosto**

DIRECTOR:

**María Cascales Angosto**

**Madrid, 2015**

M<sup>o</sup> del Carmen Cascales Angosto

TP  
1980  
029



\* 5 3 0 9 8 5 2 8 6 2 \*  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

X-53-225324 -1

EFFECTOS DEL ETANOL Y ACETALDEHIDO  
SOBRE EL METABOLISMO GLUCIDICO  
Y LIPIDICO EN HIGADO DE RATA

Departamento de Bioquímica  
Facultad de Farmacia  
Universidad Complutense de Madrid  
1980



BIBLIOTECA

© M<sup>a</sup> Carmen Cascales Angosto  
Edita e Imprime la Editorial de la Universidad  
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía  
Noviciado, 3 Madrid-8  
Madrid, 1980  
Xerox 9200 XB 480  
Depósito Legal: M-5803-1980

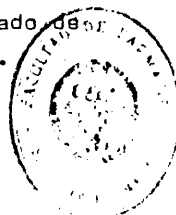
FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA

EFFECTO DEL ETANOL Y ACETALDEHIDO SOBRE EL  
METABOLISMO GLUCIDICO Y LIPOIDICO EN HIGADO DE RATA

Memoria presentada por:  
CARMEN CASCALES ANGOSTO  
para aspirar al grado de  
DOCTOR EN FARMACIA.

Madrid, julio 1979.



El presente trabajo ha sido realizado en Sección de Enzimología del Departamento de Bioquímica (Centro Coordinado del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y de la Universidad) de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, durante los cursos académicos de 1976-77, 1977-78 y 1978-79, bajo la dirección de la Dra MARIA CASCALES ANGOSTO, Investigador Científico del C.S.I.C. y Jefe de la Sección de Enzimología.

MI AGRADECIMIENTO A:

- Profesor Dr. D. Angel Santos Ruiz, Director del Departamento por su amable acogida en este Laboratorio y por el interés y ayuda prestados.
- Dra. María Cascales por la magistral dirección de este trabajo.
- Dra. Blanca Feijóo por haberme introducido en el campo de la investigación científica.
- Dra. Pilar González González por sus valiosos consejos.
- Dr. Sebastian Cerdán por su ejemplo e infatigable ayuda.
- Rosario Santos-Ruiz, por su desinteresada colaboración.
- Dr. Miguel Dean y Dr. José M<sup>a</sup> Culebras por las útiles enseñanzas prestadas en todo momento.
- Dolores Velasco Pérez por su incondicional amistad y ayuda.
- Carmen Martí y Miguel Fernández Ramil por su gran compañerismo durante el trabajo realizado.
- M<sup>a</sup> Dolores Guillén y Teresa Lupiani por su incondicional colaboración y amistad.
- A todos los compañeros del laboratorio y al personal del Departamento.

### ABREVIATURAS

AC: Acetil-CoA carboxilasa (EC 6.4.2.1.).

ADP: Adenosin 5 difosfato.

ADH: Alcohol deshidrogenasa (Alcohol:NAD oxido-reductasa)  
EC 1.1.1.1.

ALD: Aldolasa (Fructosa 1-6-difosfato:D-gliceraldehido-3-  
fosfato liasa) EC 4.1.2.13.

AMP: Adenosin 5 Monofosfato.

ATP: Adenosin 5 Trifosfato.

ATP-CL: ATP-citrato liasa (citrato oxalacetato liasa ATP  
dependiente) EC 4.1.3.8.

C: Citosol.

CS: Citrato sintetasa (citrato oxalacetato liasa) EC 4.1.3.7.

CoA: Coenzima A.

DHAP: Dihidroxiaceton fosfato.

D.O.: Densidad óptica.

1,3 DPG: 1,3-difosfoglicerato.

EDTA: Etilen diamino tetraacético.

ENOL: Enolasa (2-fosfo-D-glicerato hidrolasa). EC 4.2.1.11.

Fasa: Fumarasa.

F6P: Fructosa 6 fosfato

FDP: Fructosa difosfato.

FFA: Acidos grasos libres.

g: gramo.

G6P: Glucosa-6-fosfato.



G6PDH: Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (D-glucosa 6-fosfato:  
NADP 1-oxido-reductasa) EC 1.1.1.49.

GAPDH: Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (D gliceral-  
dehído 3 fosfato: NAD óxido-reductasa fosforilante)  
EC 1.2.1.12.

GDH<sub>3</sub>: Glicerol fosfato deshidrogenasa soluble (L-glicerol-3  
fosfato: NAD 2-óxido-reductasa) EC 1.1.1.8.

GK: Glucocinasa (ATP:D-glucosa-6-fosfotransferasa)  
EC 2.7.1.2.

Glick: Glicerocinasa (ATP:glicerol-3-fosfotransferasa)  
EC 2.7.1.30.

Glc: Glucosa.

GLDH: Glutamato deshidrogenasa (L-glutamato:NAD(P) óxido-  
reductasa desaminante) EC 1.4.1.3.

HK: Hexocinasa (ATP:D-hexosa-6-fosfotransferasa)  
EC 2.7.1.1.

IDH ó ICDH(NADP): Isocitrato deshidrogenasa (l-isocitrato:  
NADP óxido-reductasa descarboxilante)  
EC 1.1.1.42.

Keq: constante de equilibrio.

αKG: α-cetoglutarato o 2-oxoglutarato.

Lac: Lactato.

LDH: Lactato deshidrogenasa (L-lactato: NAD óxido-reductasa)  
EC 1.1.1.27.

M: mitocondria.

MDH: Malato deshidrogenasa (L-malato: NAD óxido-reductasa)  
EC 1.1.1.37.



ME: Enzima málico o malato deshidrogenasa descarboxilante  
(L-malato: NADP óxido-reductasa descarboxilante)

EC 1.1.1.40.

NAD(P): Nicotinamida adenin dinucleótido (fosfato) oxidado.

NAD(P)H: Nicotinamido adenin dinucleótido (fosfato) reducido.

nm: Nanómetro.

$\beta$ -OHBDH ó 3HBDH:  $\beta$ -hidroxibutirato deshidrogenasa (D-3-hidroxi-  
butirato:NAD óxido-reductasa) EC 1.1.1.30.

OAA: Oxalacetato.

6PGDH: 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6-fosfo-D-gluconato:  
NADP 2-óxido-reductasa descarboxilante) EC 1.1.1.44.

2 PG: 2-fosfoglicerato.

3 PG: 3-fosfoglicerato.

6 PG: 6-fosfogluconato.

PEP: fosfoenolpiruvato.

PFK: fosfofructocinasa (ATP:D-fructosa-6-fosfato-1-fosfo-  
transferasa) EC 2.7.1.11.

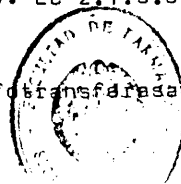
PGI: fosfoglucosa isomerasa (D-glucosa-6-fosfato cetol-  
isomerasa) EC 5.3.1.9.

PGK: fosfogliceratocinasa (ATP:3 fosfo-D-glicerato-1-  
fosfotransferasa) EC 2.7.2.3.

PGM: fosfogliceratomutasa (2-3 Bisfosfo D-glicerato:  
2-fosfo-D-glicerato fosfotransferasa). EC 2.7.5.3.

Pi: Fósforo inorgánico.

PK: Piruvatocinasa (ATP:Piruvato-2-o-fosfotransferasa)  
EC 2.7.1.40.



TIM: Triosa fosfato isomerasa (D-gliceraldehído-3-fosfato  
cetol isomerasa) EC 5.3.1.1.

VLD Lipoproteínas: Lipoproteínas de muy baja densidad.



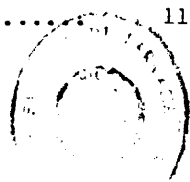
## I N D I C E

	<u>Pág.</u>
1.- INTRODUCCION .....	1
2.- PARTE TEORICA.	
2.1.- Hepatopatías alcohólicas .....	7
2.2.- Etanol y acetaldehído como tóxicos hepá- ticos .....	9
2.2.1.- Aspectos bioquímicos del metabolismo del etanol en hígado .....	15
2.3.- Glucolisis en hígado .....	21
2.3.1.- Sistema glucolítico de Embden-Meyerhof en hígado .....	23
2.3.1.1.- Enzimas clave de la glucolisis y su regulación .....	29
2.3.2.- Ciclo de los pentosa-fosfatos .....	41
2.3.2.1.- Segmento oxidativo del ciclo de los pentosas fosfatos. Regulación.....	44
2.4.- Metabolismo lipídico en hígado .....	50
2.5.- Estado redox de los piridín nucleótidos en hígado de rata. Influencias reguladoras..	60
3.- PARTE EXPERIMENTAL.	
3.1.- Material y métodos .....	72
3.1.1.- Material:	
Animales, aparatos, reactivos .....	72



	<u>Pág.</u>
3.2.- Métodos:	
3.2.1.- Intoxicación .....	73
3.2.2.- Perfusion o lavado .....	74
3.2.3.- Preparación de extractos para determina- ciones enzimáticas .....	76
3.2.4.- Determinaciones enzimáticas. Generalidades.	79
3.2.4.1.- Hexocinasas y glucocinasa. Cálculo de su perfil enzimático .....	81
3.2.4.2.- Fosfofructocinasa .....	86
3.2.4.3.- Aldolasa .....	87
3.2.4.4.- Piruvato cinasa .....	89
3.2.4.5.- $\alpha$ -glicerofosfato deshidrogenasa soluble	90
3.2.4.6.- Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa .....	91
3.2.4.7.- 6-fosfogluconato deshidrogenasa .....	92
3.2.4.8.- Isocitrato deshidrogenasa NADP soluble..	93
3.2.4.9.- Enzima málico .....	94
3.2.4.10.- ATP citrato liasa .....	94
3.2.4.11.- Malato deshidrogenasa .....	95
3.2.4.12.- Glutamato deshidrogenasa .....	96
3.2.5.- Preparación de extractos para la determi- nación de metabolitos .....	97
3.2.5.1.- Determinación de dos o más metabolitos en la mínima cubeta mediante sistemas enzimáticos acoplados (ADP y AMP).....	100

	<u>Pág.</u>
3.2.5.2.- Glucosa y glucosa-6-fosfato.....	103.
3.2.5.3.- Glucosa-6-fosfato y fructosa-6-fosfato.	104
3.2.5.4.- Piruvato, fosfoenol piruvato, 2-fosfo- glicerato y 3-fosfoglicerato.....	105
3.2.5.5.- Lactato .....	106
3.2.5.6.- $\beta$ -OH- butirato .....	107
3.2.5.7.- Acetoacetato y 2-oxoglutarato .....	108
3.2.5.8.- ATP .....	109
3.2.5.9.- ADP y AMP .....	110
3.2.5.10.- NAD .....	111
3.2.5.11.- NADP .....	112
3.2.5.12.- $\alpha$ -glicerol-fosfato y malato .....	113.
3.2.5.13.- Glicerol .....	114.
3.2.5.14.- Citrato .....	115.
3.2.5.15.- Amonio libre .....	115
3.2.5.16.- Glutamato .....	116
3.2.5.17.- Proteínas solubles .....	116
4.- RESULTADOS.	
4.1.- Variaciones en el incremento de peso corpo- ral y en la relación peso hígado/peso cuer- po en ratas sometidas a los diferentes tra- tamientos de etanol y/o acetaldehído y die- ta grasa durante tres meses .....	118



Pág.

4.2.- Variaciones en los niveles de proteínas solubles de las fracciones citosólica y mitocondrial en hígado de ratas sometidas a los diferentes tratamientos de etanol y/o acetaldehído y dieta grasa durante tres meses .....	121
4.3.- Niveles de metabolitos y actividades enzimáticas de la vía glucolítica Embden-Meyerhof en hígado de ratas sometidas a los diferentes tratamientos de etanol y/o acetaldehído y dieta grasa durante tres meses .....	124
4.4.- Variaciones de las actividades enzimáticas solubles NADP dependientes: Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa, isocitrato deshidrogenasa y enzima málico en hígado de ratas sometidas a los diferentes tratamientos de etanol y/o acetaldehído y dieta grasa durante tres meses.....	153
4.5.- Variaciones en la actividad de la ATP citrato liasa, malato deshidrogenasa de la fracción soluble y glutamato deshidrogenasa de la fracción mitocondrial en hígado de ratas sometidas a los diferentes tratamientos de etanol y/o acetaldehído y dieta grasa durante tres meses .....	161

Pág.

4.6.- Variaciones de metabolitos relacionados con el estado redox citosólico y mitocondrial: $\beta$ -hidroxibutirato, acetoacetato, malato, citrato, amonio, $\alpha$ -cetoglutarato, glutamato y glicerol en hígado de ratas sometidas a los diferentes tratamientos de etanol y/o acetaldehído y dieta grasa durante tres meses .....	166
4.7.- Variaciones en los niveles de adenin nucleótidos en hígado de ratas sometidas a diferentes tratamientos de etanol y/o acetaldehído y dieta grasa durante tres meses .....	178
4.8.- Variaciones en los potenciales redox citosólicos y mitocondriales en hígado de ratas tratadas con etanol y/o acetaldehído y dieta grasa durante tres meses .....	185
5.- DISCUSION .....	191
6.- RESUMEN Y CONCLUSIONES .....	221
7.- BIBLIOGRAFIA .....	228



## 1.- INTRODUCCION



## I.- INTRODUCCION

El uso de bebidas alcohólicas por el hombre surge desde tiempos remotos. Las propiedades del etanol capaces de modificar en el hombre su comportamiento y estado de ánimo han sido conocidas por todos los pueblos y ha hecho que su uso y abuso permanezca hasta hoy, pudiendo considerarlo como el tóxico más consumido. El etanol posee un valor calórico que bajo ciertas circunstancias puede ser beneficioso, debido a que puede ser totalmente oxidado en el organismo por vías metabólicas comunes a nutrientes normales. Sin embargo, el etanol como sucede con todas las drogas o fármacos y muchos nutrientes, cuando se ingiere en cantidades que sobrepasan la capacidad del organismo para su eliminación metabólica, puede ser muy perjudicial. El abuso crónico del etanol está siendo hoy día tema de creciente interés en el campo de la investigación sobre el metabolismo del etanol, el alcoholismo y sus efectos sobre el organismo.

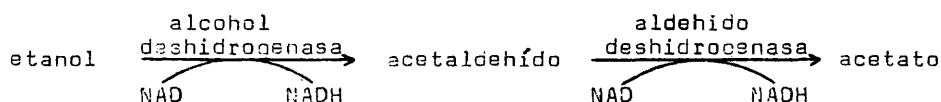
A pesar de su etiología todas las enfermedades están acompañadas por alguna alteración de la nutrición celular que se combina con los efectos específicos de la enfermedad. Quizás la combinación más discutida en los últimos tiempos, haya sido la del alcoholismo asociado a la malnutrición. Lo interesante sería conocer qué papel juegan estos dos efectos interrelacionados sobre el desarrollo de la enfermedad hepática.

tica alcohólica. En animales de experimentación o en humanos, la investigación del efecto del alcohol y sus metabolitos o de los nutrientes específicos es muy difícil debido a los mecanismos de homeostasis que posee el organismo. Así, para comprender cómo el etanol y/o la nutrición alterada puede afectar al metabolismo celular, es necesario desarrollar métodos específicos y modelos de forma que cada entidad pueda evaluarse por separado.

El primer problema para comprender el metabolismo del etanol es estudiar los enzimas responsables de su metabolismo, - porque la duración y el grado de sus efectos tóxicos y farmacológicos depende de la velocidad de su degradación metabólica.

El hígado es el órgano donde se verifica la mayor parte - del metabolismo del etanol. Esta especificidad explica el que sea el hígado el órgano más lesionado por efecto de la toxicidad del etanol. El etanol se metaboliza mediante dos reacciones oxidativas, cada una de ellas catalizada por una deshidrogenasa NAD dependiente: la alcohol y la aldehído deshidrogenasa. Gran parte de los efectos tóxicos del etanol y las anomalías fisiológicas producidas se deben a los dos productos de su oxidación, el acetaldehído y el NADH. Cuando el etanol se oxida por efecto de la alcohol deshidrogenasa, se origina acetaldehído y NADH en el compartimento citosólico del hepatocito. También la oxidación del acetaldehído a acetato está -

asociada con la formación de NADH en el citosol o en la mitocondria.



Como la oxidación de etanol a acetato está asociada con el incremento del cociente NADH/NAD, es importante tratar de explicar las interacciones del metabolismo del etanol con las diferentes vías biosintéticas y degradativas del hígado, con el objeto de establecer la localización funcional de los dos pasos deshidrogenantes implicados en el proceso degradativo. La alcohol deshidrogenasa está localizada exclusivamente en el citoplasma, por lo que un equivalente al menos de NADH, por mol de etanol metabolizado por esta vía, se genera fuera de la mitocondria. Estudios de fraccionamiento subcelular han revelado que un 80% de la actividad total de la aldehído deshidrogenasa del hígado de rata se encuentra en la mitocondria. Por tanto es de suponer que el acetaldehído formado en el citosol, atravesará la membrana mitocondrial y una parte de él se oxidará en la mitocondria, con lo que una parte de los equivalentes reductores originados en la oxidación del etanol se generará en la mitocondria.

El estudio de las actividades enzimáticas de la alcohol y aldehído deshidrogenasa ha sido ya llevado a cabo en nuestro laboratorio por Santos Ruiz y Cascales (1979) junto con el

efecto que sobre la actividad de estos enzimas pueden ejercer sustancias protectoras hepáticas y movilizadoras de grasas, administradas en hepatopatía grasa alcohólica obtenida experimentalmente.

En el trabajo que presentamos se estudia el efecto de la intoxicación crónica con etanol y/o acetaldehído, sobre la glucolisis en su doble aspecto: vía de Embden-Meyerhof y vía de los pentosa fosfatos y sobre aquellos enzimas citosólicos relacionados con la lipogénesis como son la isocitrato deshidrogenasa, enzima málico, ATP - citrato liasa y malato deshidrogenasa. Con esta panorámica tratamos de resolver el efecto del etanol y del acetaldehído sobre el posible incremento de la lipogénesis hepática en casos de alcoholismo.

Los enzimas citosólicos NADP dependientes citados enzima málico e isocitrato deshidrogenasa y además la ATP citrato - liasa y la malato deshidrogenasa, intervienen directamente en el mecanismo de lanzadera malato-oxalacetato, que tiene como función la de transferir a la mitocondria los equivalentes en exceso generados en el citosol. Los enzimas citosólicos NADP dependientes entre los que se incluyen las dos deshidrogenasas del ciclo de los pentosa fosfatos, están íntimamente relacionados con los procesos de biosíntesis citosólicos NADPH dependientes y entre los que la lipogénesis consume más del 50% de los equivalentes reductores generados por estos enzimas.

La  $\alpha$ glicero fosfato deshidrogenasa estudiada por nosotros entre los enzimas de la glucólisis, genera el  $\alpha$ glicero fosfato necesario para la esterificación de los ácidos grasos de cadena larga y además este enzima citosólico, junto con su correspondiente mitocondrial, forman con el  $\alpha$ glicero fosfato y el dihidroxiaceton fosfato otro sistema lanzadera transportador de equivalentes reductores a la mitocondria.

Con la citrato liasa ATP dependiente tratamos de completar todos los eslabones necesarios para que se lleve a cabo la síntesis y elongación de los ácidos grasos. La ATP citrato liasa desdobla el citrato en oxalacetato y acetil CoA. Este acetil CoA junto con los equivalentes reductores en forma de NADPH y por acción de la ácido graso sintetasa, dará origen a los ácidos grasos de cadena larga, los cuales se esterifican con el  $\alpha$ glicero fosfato dando lugar a los mono, di y tri glicéridos.

El estudio de los niveles de metabolitos implicados en estas vías metabólicas y de los nucleótidos energéticos completarán este trabajo a la vez que nos permitirán el cálculo de los potenciales redox citosólico y mitocondrial en las condiciones de intoxicación con etanol y/o acetaldehído.

La administración oral de etanol y/o acetaldehído a ratas en el agua de bebida, nos ha parecido la más adecuada, teniendo en cuenta que tratamos de conseguir un estado crónico de intoxicación lo más parecido al que sufre el al-

cohólico. La dieta rica en grasa trata de asemejarse en su contenido lipídico (45 - 48% calórico) al normal de una - dieta en EE.UU (Lieber, 1968) o en España. La administración de acetaldehído, también en el agua de bebida, al 2%, se debe al enorme interés de este compuesto altamente tóxico, sobre las rutas del metabolismo estudiado. A pesar de que en - la bibliografía apenas hemos encontrado nada respecto a la - administración de acetaldehído, han sido dos factores los - que nos han inducido a estudiar el efecto directo de este - compuesto. En primer lugar nos interesa saber cómo actúa sobre el metabolismo hepático este primer producto de la oxidación del etanol y aunque sabemos que el hepatocito cuenta - con varias aldehído deshidrogenasas distribuídas en los diferentes compartimentos celulares, si la cantidad de etanol oxidado es elevada, algún acetaldehído quedará residual que puede ejercer su efecto tóxico específico.

En segundo lugar nuestro interés por estudiar el efecto del acetaldehído se basa también en el conocimiento de que - los vinos de crianza contienen en su composición del 1 al 2% de aldehídos, que son los causantes del aroma y sabor especiales.

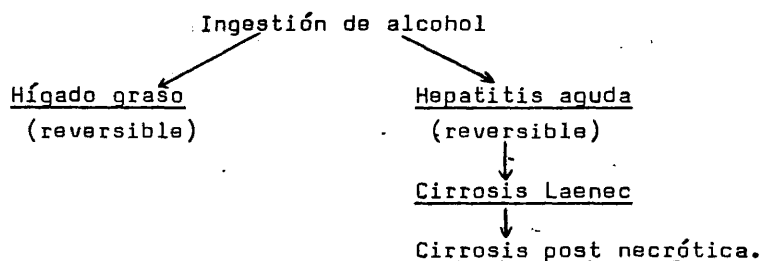
El acetaldehído se administró en dosis muy pequeñas (2% aproximadamente 0,4 M) ya que los efectos tóxicos del acetaldehído son muchos mayores que los del etanol, el cual se administró en concentraciones 10 veces superior (4M).

## 2.- P A R T E   T E O R I C A



## 2.1.- Hepatopatías alcohólicas.

Durante mucho tiempo se ha reconocido como hepatopatía - alcohólica la principal complicación del alcoholismo crónico en el hombre. Son muchos los trabajos que han estudiado la - variedad de desarreglos patológicos y metabólicos en hígado originados por ingestión de alcohol, en los que también están implicados otros órganos. Por encima de las muchas y diversas disfunciones metabólicas inducidas por el alcoholismo crónico, la hepatopatía alcohólica permanece de interés central como - un factor primordial de morbilidad y mortalidad. Los avances en el conocimiento de los síndromes clínicos y patológicos de esta hepatopatía han proporcionado un amplio campo para la investigación de los mecanismos metabólicos afectados más direc- tamente en los diferentes estadios de la enfermedad. Las for- mas clínicas de hepatopatía alcohólica y su evolución son las siguientes:





No se conoce el nivel preciso de consumo de alcohol que da lugar a la lesión hepática, excepto en el caso de hígado graso donde cantidades relativamente pequeñas de etanol son suficientes para provocarlo. Algunos trabajos han indicado que la consumición diaria de 80-160 g. de etanol durante periodos de 5-15 años dan lugar a una incidencia sustancialmente elevada de cambios severos funcionales y ultraestructurales en el hígado.

Es bien sabido que muchos alcohólicos crónicos están mal nutridos. Sin embargo existen muchos de ellos que no manifiestan pérdida sustancial de peso, deficiencias vitamínicas u otras evidencias de malnutrición. Por tanto es improbable que la disminución calórica sea únicamente el factor principal que da origen a la aparición de enfermedad alcohólica hepática.

La infiltración de grasa en el hígado es una alteración bastante común entre los alcohólicos crónicos. Estudios de Lieber y Rubin (1968) y Rubin y Lieber (1968) han demostrado que la ingestión de etanol en dosis que fluctúan entre 70-270 g/día, durante periodos no superiores a 14 días pueden dar origen a un contenido incrementado de grasa en el hígado. Esto se ha demostrado tanto en voluntarios normales como también en bebedores crónicos. Tales hallazgos sugieren que la mayoría de alcohólicos han de manifestar infiltración grasa del hígado originada a lo largo de los años de alcoholis-

mo. Diversos estudios han confirmado una incidencia de infiltración grasa hepática en el 70-90% de bebedores crónicos, de terminada por una biópsia de hígado (Ugarte y cols., 1970; - Leibach, 1971; Christoffersen y Nielsen, 1972 y Devenyi y cols. 1970).

Existe, sin embargo, un pequeño grupo de individuos más - resistentes a la infiltración grasa, debido a factores genéticos, metabólicos o nutricionales.

## 2.2.- Etanol y acetaldehído como tóxicos hepáticos.

El hígado es el lugar donde se realiza la mayor parte del metabolismo del etanol, siendo por tanto este órgano el que - se lesiona más directamente por efecto de la toxicidad del - etanol.

El metabolismo del etanol comprende dos reacciones oxidativas cada una de ellas catalizada por una deshidrogenasa NAD<sup>+</sup> dependiente: la alcohol y la aldehído deshidrogenasas: la - alcohol deshidrogenasa citosólica y las aldehídos deshidrogenasas citosólica y mitocondrial. En este doble proceso oxidativo se produce acetaldehído, acetato y NADH. Los efectos del etanol pueden atribuirse a los dos primeros productos de su - oxidación, el acetaldehído y el NADH. La generación de dos - equivalentes de NADH por cada molécula de etanol que se oxida a acetato, produce un incremento en el cociente NADH/NAD al - cual se deben gran parte de los efectos tóxicos del etanol sobre el hígado, ya que ello origina un desequilibrio hacia un

estado más reducido. Para contrarrestar estos efectos, la célula funcional hepática tiene que utilizar diversas rutas metabólicas dependientes de los equivalentes reductores, algunas veces con efectos perniciosos.

El etanol puede también ser metabolizado en hígado por un sistema microsómico oxidativo con requerimientos coenzimáticos similares a los de los sistemas desintoxicadores de fármacos (Orme-Johnson y Ziegler, 1965; Lieber y De Carli, 1968) y cuyo papel en el metabolismo del etanol no está aún bien esclarecido. Este sistema, presente principalmente en hígado y cuyo requerimiento coenzimático es el NADPH, es inducible a diferencia de la alcohol deshidrogenasa citosólica, y en trabajos recientes de Havre y cols. (1977) se ha comprobado que el grado en el que este sistema microsómico puede llegar a contribuir al metabolismo del etanol en el hepatocito, oscila entre 8-11%. De estas observaciones se deduce que no puede compararse cuantitativamente la actividad in vivo del sistema microsómico de oxidación del etanol con la alcohol deshidrogenasa, pero la mera existencia en el hepatocito de un sistema adaptativo que oxida el etanol, puede ser muy útil para explicar muchas observaciones sobre los efectos tóxicos del etanol. Estas observaciones comprenden la proliferación del retículo endoplásmico liso y el incremento de la actividad desintoxicadora de fármacos. El etanol estimula la síntesis hepática de colesterol, efecto que tiene también lugar después de la admi

nistración de barbitúricos (Jones y Armstrong, 1965; Lieber y De Carli, 1964). Los microsomas hepáticos son también el lugar de esterificación de ácidos grasos y de producción de lipoproteínas (Stein y Stein, 1967). Es por tanto fácil especular que el efecto del etanol sobre los microsomas incrementa la lipogenesis y la formación de lipoproteínas que - juntas contribuyen a la hiperlipemia alcohólica (Lieber, - 1968).

Dejando a un lado las complicaciones metabólicas del exceso de equivalentes reductores, que se analizarán más adelante al hablar de los aspectos bioquímicos de la oxidación del etanol, y los cambios adaptativos de la actividad microsómica, la consumición elevada de etanol ejerce efectos tóxicos directos sobre el tejido hepático. Parece ser que el compuesto responsable de la toxicidad del etanol es el acetaldehído, primer producto de su oxidación y de gran capacidad reactiva y que afecta a la mayoría de los tejidos del organismo. La mayor parte del acetaldehído se oxida en la mitocondria convirtiéndose en acetato, pero una parte escapa al torrente circulatorio. Tanto la alcohol deshidrogenasa como las vías microsómicas pueden llegar a saturarse cuando el hígado está cargado con una gran cantidad de etanol, así que el acetaldehído en sangre alcanza un nivel y permanece en esta concentración hasta que el etanol disminuye en cuyo punto la vía microsómica aparentemente se desconecta.

Se ha visto que la concentración de acetaldehído en sangre es más elevada en los alcohólicos que en los no alcohólicos, incluso cuando ambos grupos ingirieron y alcanzaron en sangre la misma cantidad de etanol. Este nivel anormalmente elevado de acetaldehído en el alcohólico puede ser resultado de un metabolismo más rápido en la degradación de etanol, o de un metabolismo más lento en la del acetaldehído o de ambos factores a la vez. Las alteraciones que tienen lugar en la mitocondria han podido ser observadas al microscopio electrónico por Rubin (1971 y 1975) incluso en los primeros estadios de la intoxicación etílica. Las mitocondrias dañadas tienen una capacidad disminuída para metabolizar el acetaldehído. El mismo acetaldehído puede ser el responsable de la disminución funcional de la mitocondria por su efecto tóxico directo sobre este orgánulo. Por tanto, el alcohólico resulta víctima de un círculo vicioso: el alto nivel de acetaldehído deteriora la función mitocondrial del hepatocito, el metabolismo del acetaldehído decrece, se acumula acetaldehído y este acúmulo origina una mayor lesión hepática.

El acetaldehído es tóxico también en otros tejidos, por ejemplo Oratz y Rothschild (1975) han descrito como el acetaldehído a concentraciones no tan elevadas como la observada en sangre de alcohólicos, puede inhibir la síntesis de proteínas en el músculo cardíaco. Tal efecto explica parte de las lesiones cardíacas que son comunes a los alcohólicos.

El acetaldehído ejerce también efectos notables sobre el cerebro. Algunos investigadores han sugerido que el acetaldehído es el verdadero responsable del desarrollo de la dependencia que unida a la tolerancia caracteriza a los adictos alcohólicos. Se han propuesto algunos mecanismos mediados por el acetaldehído para explicar la dependencia. Uno de ellos está basado en el hecho de que ciertas aminas neurotransmisoras se inactivan por acción de la monoamino-oxidasa para formar un aldehído que se transforme posteriormente en ácido.

Cohen y Collins (1970) han demostrado que el acetaldehído se condensa con la dopamina formando derivados isoquinolínicos y han propuesto que estos compuestos pueden tener efectos fisiológicos sobre el organismo. Walsh y cols, (1970) - han propuesto que el acetaldehído previene la oxidación normal de la dopamina a su ácido y que el correspondiente aldehído se condensa con otra molécula de dopamina formando derivados de la tetrahidropapaverolina.

Otra posibilidad apuntada (Chalvardjian, 1970) es que el acetaldehído se combine directamente con aminas originando - derivados isoquinolínicos de acción psicoactiva potente que pueden jugar un papel en el desarrollo de la dependencia.

Se ha propuesto que sea la aldehído deshidrogenasa el - principal regulador para la oxidación del acetaldehído durante el metabolismo del etanol en hígado de rata (Eriksson, -

1973). La oxidación del acetaldehído se ha observado que tiene poco efecto sobre el estado redox citosólico (Lindros y cols. 1972) y un efecto muy pronunciado sobre el estado redox mitocondrial (Parrilla y cols., 1974). Se ha demostrado la existencia de una aldehído deshidrogenasa de Km baja ( $10 \mu\text{M}$  para el -acetaldehído) en la mitocondria y unos enzimas de Km elevada - (en el rango molar) en el citosol, en la fracción microsómica y en la mitocondria (Deitrich, 1966; Koivula y Koivusalo, 1975; Marjanen, 1972; Tottmar y cols., 1974). Estos resultados unidos al hecho de que las concentraciones de acetaldehído varían entre 100 y 250 nanomoles, por gramo de hígado, durante el metabolismo del etanol, sostienen la enorme importancia de la oxidación mitocondrial del acetaldehído. Como la mayor parte de -este acetaldehído se oxida inmediatamente en hígado, los cambios por pequeños que fuesen en la actividad de los enzimas -oxidantes pueden tener un efecto relativamente grande sobre la eliminación del acetaldehído por el hígado.

Eriksson y cols, 1975, han estudiado el efecto del fenobarbital como inductor de la aldehído deshidrogenasa citosólica -con el objeto de obtener grupos de animales con diferentes actividades citosólica. Estos trabajos unidos a los de Deitrich (1971), han demostrado que el fenobarbital no ejerce influencia sobre la aldehído deshidrogenasa mitocondrial, aunque dadas las diferencias entre las actividades citosólica y mitocondrial parece posible que una pequeña parte del enzima indu

cido estuviera ligada a la fracción mitocondrial aislada y pudiera contar para la diferencia observada en caso de elevadas concentraciones de acetaldehído.

#### 2.2.1.- Aspectos bioquímicos del metabolismo del etanol en hígado.

En el doble proceso oxidativo del etanol en hígado se generan equivalentes reductores que dan origen a un incremento en el cociente  $\text{NADH}/\text{NAD}$  el cual produce un desequilibrio hacia un estado más reducido. Para evitar esto, la célula funcional hepática tiene que utilizar diversas rutas metabólicas dependientes de los equivalentes reductores y que transfieren el hidrógeno desde el coenzima reducido a un sustrato con el objeto de regenerar dicho coenzima en forma oxidada.

Una de estas rutas es la gluconeogénesis y otra la conversión de piruvato en lactato. La gluconeogénesis se origina a partir de los aminoácidos derivados de la rotura de las proteínas, los cuales se convierten en piruvato y de ahí en glucosa. Si la gluconeogénesis está bloqueada al ser convertido el piruvato en lactato, el nivel de glucosa en sangre estará también disminuído. Se sabe que la hipoglucemia es una de las consecuencias del alcoholismo agudo, la cual afecta directamente al cerebro y puede llegar a producir la muerte. Por otro lado, el ácido láctico producido a partir del



piruvato por exceso de hidrogeniones, llega a la sangre originando acidosis láctica, y al riñón, <sup>donde</sup> al interferir con la excreción de ácido úrico origina hiperuricemia, causa de la aparición de ataques de gota en el alcohólico (Krebs y cols., 1967).

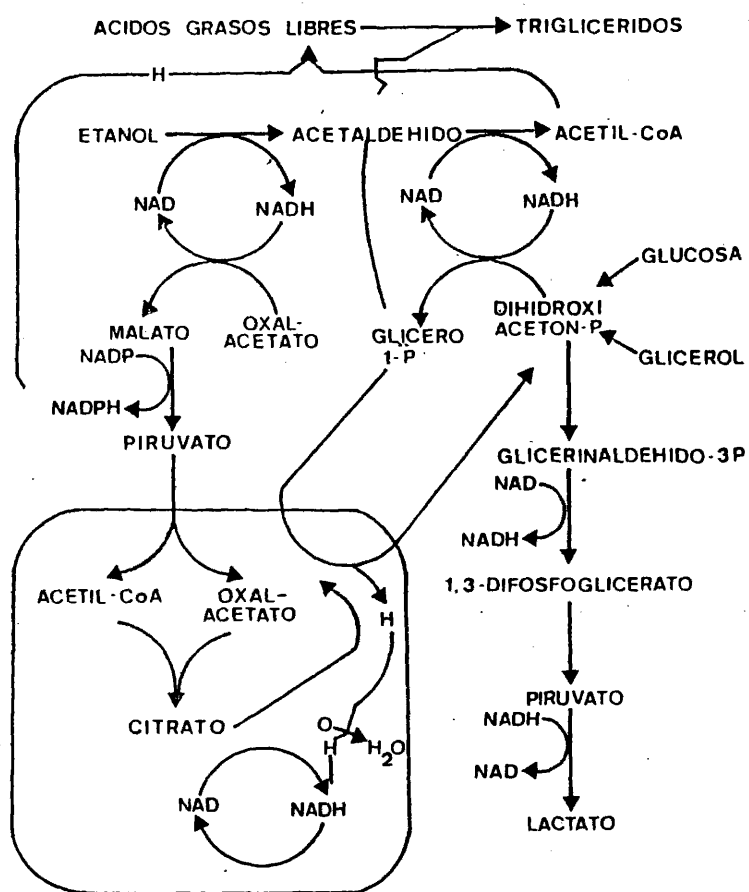
Otra vía por la cual la célula funcional hepática puede disminuir el exceso de equivalentes reductores es la formación de grasas en su doble aspecto de síntesis de ácidos grasos y de  $\alpha$ -glicerofosfato, los cuales, al reaccionar, dan origen a los triglicéridos que se acumularán dando lugar al hígado graso del alcohólico.

El principal mecanismo que tiene la célula para deshacerse del exceso de hidrogeniones es transferirlos a la mitocondria para producir energía. En condiciones normales, es la grasa la que se oxida en la mitocondria y esta oxidación da lugar a energía utilizable en forma de ATP, pero en el caso del hígado del alcohólico, la cantidad de hidrogeniones que se originan a partir de la oxidación del etanol es tan grande, que la célula los aprovecha directamente en lugar de oxidar las grasas. De esta forma, las grasas se van acumulando y dan origen a un hígado graso. Si el etanol se ingiere unido a una dieta rica en grasa, la grasa de la dieta también se acumulará, pero incluso en caso de dietas pobres en grasa, la grasa sintetizada por el hígado será la responsable del acúmulo graso. Por último, cuando el etanol es ingerido en grandes dosis, su efecto puede desencadenar descargas que movilicen las grasas desde -

sus reservas en el tejido adiposo y las conduzcan al hígado.

La oxidación del etanol se acopla también con la reducción del dihidroxiacetón fosfato a  $\alpha$ -glicerofosfato, ya que éste último metabolito se ha encontrado incrementando en ratas alcohólicas (Nikkila y Ojala, 1963). Además de su contribución al mecanismo lanzadera de equivalentes reductores a través de la membrana mitocondrial, el  $\alpha$ -glicerofosfato puede favorecer la acumulación de triglicéridos hepáticos (Howard y Lowenstein, 1964). La reducción del oxalacetato puede también acoplarse con la oxidación del etanol y el mecanismo lanzadera oxalacetato-malato, propuesto por diversos investigadores, como un mecanismo implicado en la lipogénesis a partir de la glucosa, podría también explicar cómo la oxidación del etanol, suministra en exceso los dos componentes necesarios para la síntesis de ácidos grasos: NADPH y acetil-CoA. De acuerdo con este esquema, el piruvato se difunde dentro de la mitocondria y se oxida a acetil-CoA o se convierte en oxalacetato.

Acetil-CoA y oxalacetato se condensan formando citrato, el cual entra en el ciclo cítrico o se difunde fuera de la mitocondria en el espacio extramitocondrial, donde por efecto de la citrato liasa se rompe originando acetil-CoA y oxalacetato. El acetil-CoA así originado, junto con el derivado de la oxidación de etanol y el acetaldehído, puede utilizarse para la síntesis de ácidos grasos, mientras que el oxala-



PRINCIPALES RUTAS BIOQUIMICAS IMPLICADAS EN EL METABOLISMO DEL ETANOL.



cetato puede reducirse a malato por acción de la malato deshidrogenasa y el NADH. El malato reacciona con el NADP mediante la acción del enzima málico descarboxilante y da lugar a piruvato,  $\text{CO}_2$  y NADPH. El balance efectivo de estas reacciones es que el piruvato se convierte en acetil-CoA y la oxidación del NADH ha dado origen NADPH necesario para la conversión del acetil-CoA en ácidos grasos. Mediante el acoplamiento postulado de la oxidación del etanol con la reducción de oxalacetato a malato, el etanol puede acelerar todas estas reacciones.

Se considera en general que la oxidación del etanol en hígado está limitada por la velocidad de reoxidación del NADH citosólico (Lindros y cols., 1972; Videla e Israel, 1970; Williamson y cols., 1974). No es probable que sea la misma alcohol deshidrogenasa el factor limitante, pues en ausencia de un aceptor de hidrógeno, los equivalentes reductores generados en la reacción de oxidación del etanol pueden ser transportados a la mitocondria vía una de las lanzaderas. Como es probable que el transporte de hidrógeno así transferido esté regulado por el estado redox mitocondrial (Williamson y cols. 1971), surge entonces la pregunta de si el factor determinante de la velocidad de oxidación del etanol sea la actividad de las lanzaderas transportadoras de hidrógeno a la mitocondria y ligadas al NAD, o el flujo de hidrogeniones a través de la cadena fosforilante transportadora de electrones. Pue-

den postularse, por tanto, tres factores limitantes de la oxidación del etanol en hígado: 1ª) disociación del complejo NADH-alcohol deshidrogenasa (Theorell y Chance, 1951), 2ª) transferencia de equivalentes reductores del citosol a la mitocondria (Rawat, 1973) y 3ª) velocidad de reoxidación del NADH mitocondrial (Williamson y cols., 1967).

Recientes trabajos de Meijer y cols., (1975), sugieren que la oxidación del etanol en hígado de rata en ayuno está limitada por la actividad de las lanzaderas, en contraste con el hígado de ratas alimentadas donde el factor limitante es la reoxidación mitocondrial del NADH (Meijer y von Dam, 1974).

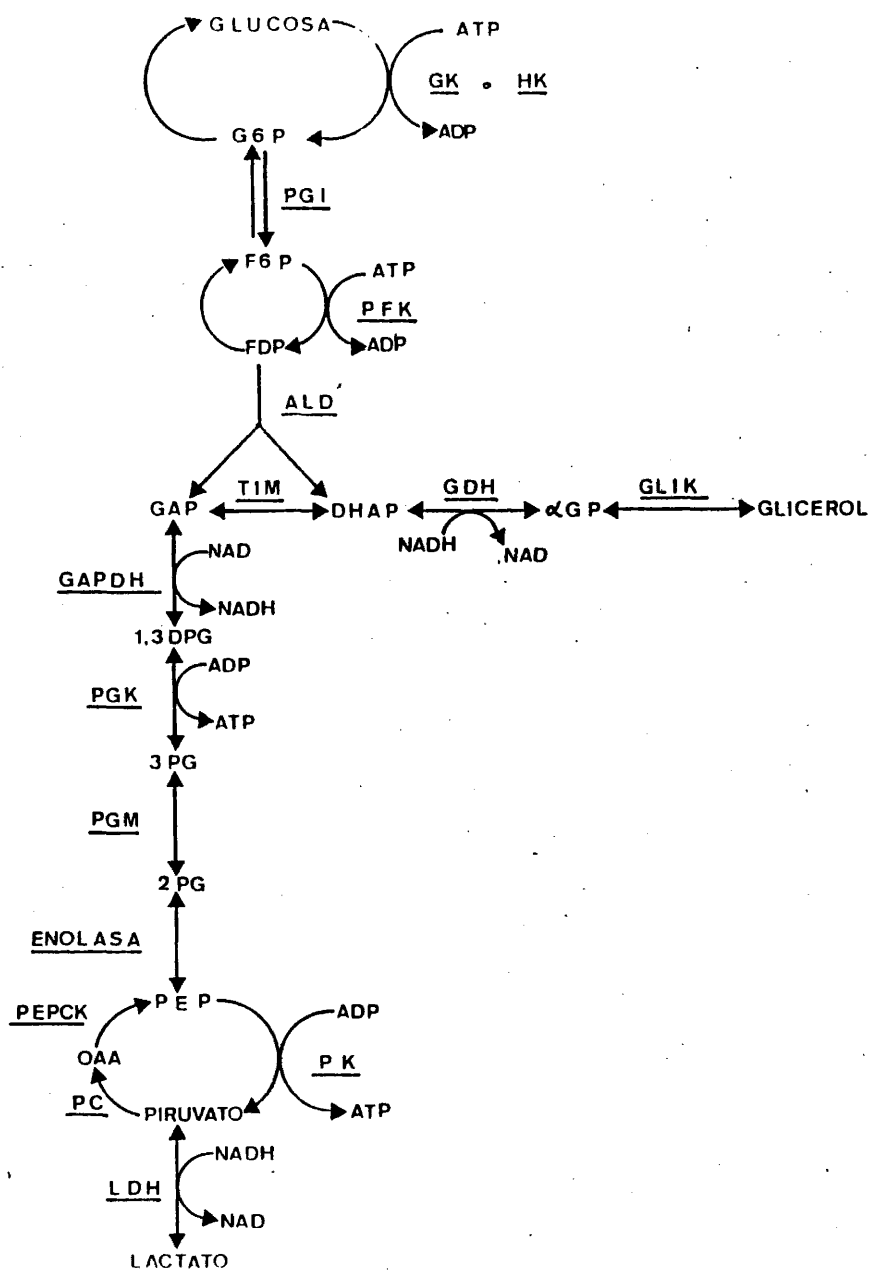


### 2.3.- Glucolisis en hígado:

Existen en hígado dos vías principales del metabolismo degradativo de la glucosa: la ruta glucolítica de Embden-Meyerhof y el ciclo de los pentosa fosfatos, también llamado "shunt de los hexosas monofosfatos" y ciclo de Warburg, Dickens, Lipmann y Horecker.

Ambos caminos difieren tanto en sus fines como en su mecanismo y grado de contribución al catabolismo total de la glucosa. Así, mientras que la glucolisis, propiamente dicha, unida al ciclo tricarboxílico tiene como misión principal el suministro de ATP y como función adicional el abastecimiento de esqueletos carbonados para la síntesis de constituyentes celulares como el glutamato, alanina, aspartato, galactosa, galactosamina y acetil-CoA, el ciclo de los pentosas fosfatos tiene como objetivo primordial la generación de equivalentes reductores en forma de NADPH necesarios para las biosíntesis reductoras del citosol, y el suministro de ribosa-5-fosfato para la síntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos.

En la figura de la página 22 se muestran esquemáticamente los caminos metabólicos que tienen lugar en la degradación y síntesis de la glucosa en el hígado de los mamíferos.



ruta glucolitica de EMBDEN-MEYERHOF

### 2.3.1.- Sistema glucolítico de Embden-Meyerhof en hígado.

La glucolisis es la ruta metabólica que degrada la glucosa convirtiéndola en piruvato vía fructosa difosfato y se encuentra presente en casi todas las células vivas. Las once reacciones que constituyen este sistema han sido ampliamente estudiadas y existen excelentes revisiones ya clásicas (Scrutton y Utter, 1968; Rose y Rose, 1969; y Cohen, 1973) (Fig.p22).

Desde el punto de vista bioquímico el hígado es uno de los órganos más diferenciados. Posee varias propiedades únicas en el metabolismo de los carbohidratos, como son su funcionamiento como órgano de almacenamiento reversible para la glucosa de la dieta y su capacidad de gluconeogénesis. La liberación de glucosa, tanto a partir del glucógeno almacenado como procedente de la gluconeogénesis, es llevada a cabo por un enzima existente únicamente en el hígado, la glucosa-6-fosfatasa. En la gluconeogénesis está implicado otro enzima único, la fructosa difosfatasa. También existen en hígado enzimas específicos para la fosforilación de fructosa y galactosa.

La célula funcional hepática se considera que es prácticamente permeable a la glucosa plasmática, que entra en el hepatocito por medio de un sistema específico de transporte (Williams y cols., 1971). Debido a esta falta de barreras, el metabolismo de la glucosa en hígado de rata está determinado por diversos enzimas clave.

Aplicando los conceptos de unidades funcionales genéticas propuestos por Weber y cols. (1966) y partiendo de las propie



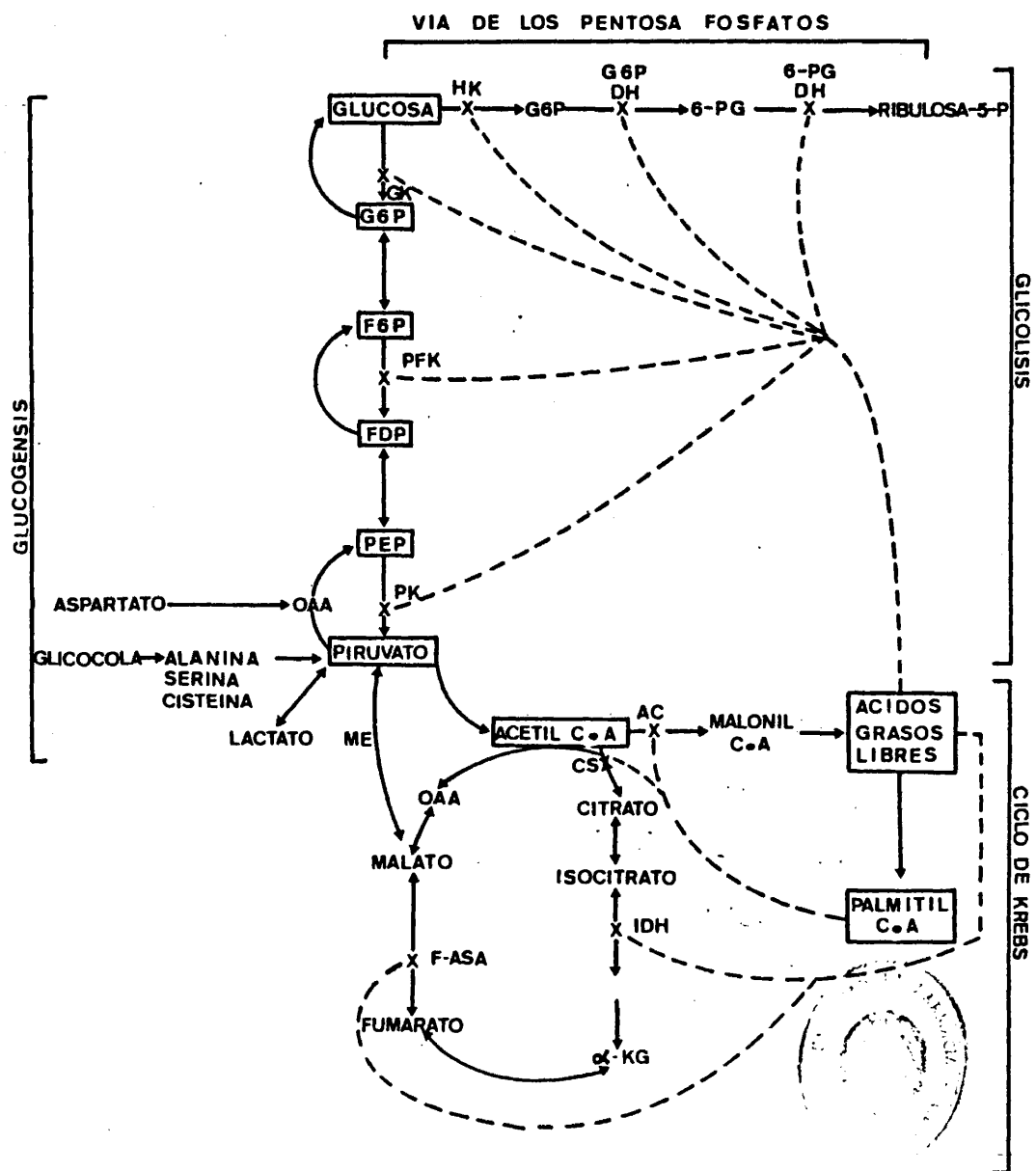
dades reguladoras y de respuesta, los enzimas encargados del metabolismo de los carbohidratos pueden dividirse en tres - clases, siendo codificado cada grupo por una unidad funcional genética distinta. (Figura de la página 25).

a).- Enzimas gluconeogénicos clave: Glucosa-6-fosfatasa, fructosa difosfatasa, fosfoenolpiruvato carboxicinasa y piruvato carboxilasa. Son los responsables de las reacciones unidireccionales que ejercen un papel limitante en la velocidad de la gluconeogénesis, y son inducidos por hormonas adrenocorticales e inhibidos por insulina (Weber, Singhal y Srivastawa, 1965). b).- Enzimas bifuncionales: Fosfoglicósaisomerasa, aldolasa, gliceraldehído-3-P deshidrogenasa, fosfoglicerato mutasa, enolasa y lactato deshidrogenasa. Son enzimas - que se encuentran en gran exceso y catalizan reacciones reversibles. c).- Enzimas glucolíticos clave: Hexocinasas, fosfofructocinasa y piruvatocinasa. Son los enzimas limitantes de la velocidad de la glucólisis y son responsables de las reacciones unidireccionales glucolíticas, que actúan en dirección opuesta a las gluconeogénicas.

El concepto de unidades funcionales genéticas sugiere que los enzimas glucolíticos clave deben comportarse de manera - similar e integrada bajo las mismas condiciones regulatorias.

Los enzimas limitantes catalizan reacciones no reversibles a ambos lados de las vías metabólicas reversibles. Los enzimas clave de la glucólisis y la gluconeogénesis actúan - sobre el "pool" de los hexosamonofosfatos y a ambos lados -

INHIBICION POR ACIDOS GRASOS LIBRES DE LOS ENZIMAS IMPLICADOS EN EL CATABOLISMO DE LA GLUCOSA EN HIGADO



del "pool" de los triosafofosatos. La dirección de estas dos vías opuestas ha de ser determinada por factores que regulan la actividad de estos enzimas (Weber, 1969). Tanto las hormonas corticoides como la insulina no ejercen apenas influencia sobre los enzimas bifuncionales.

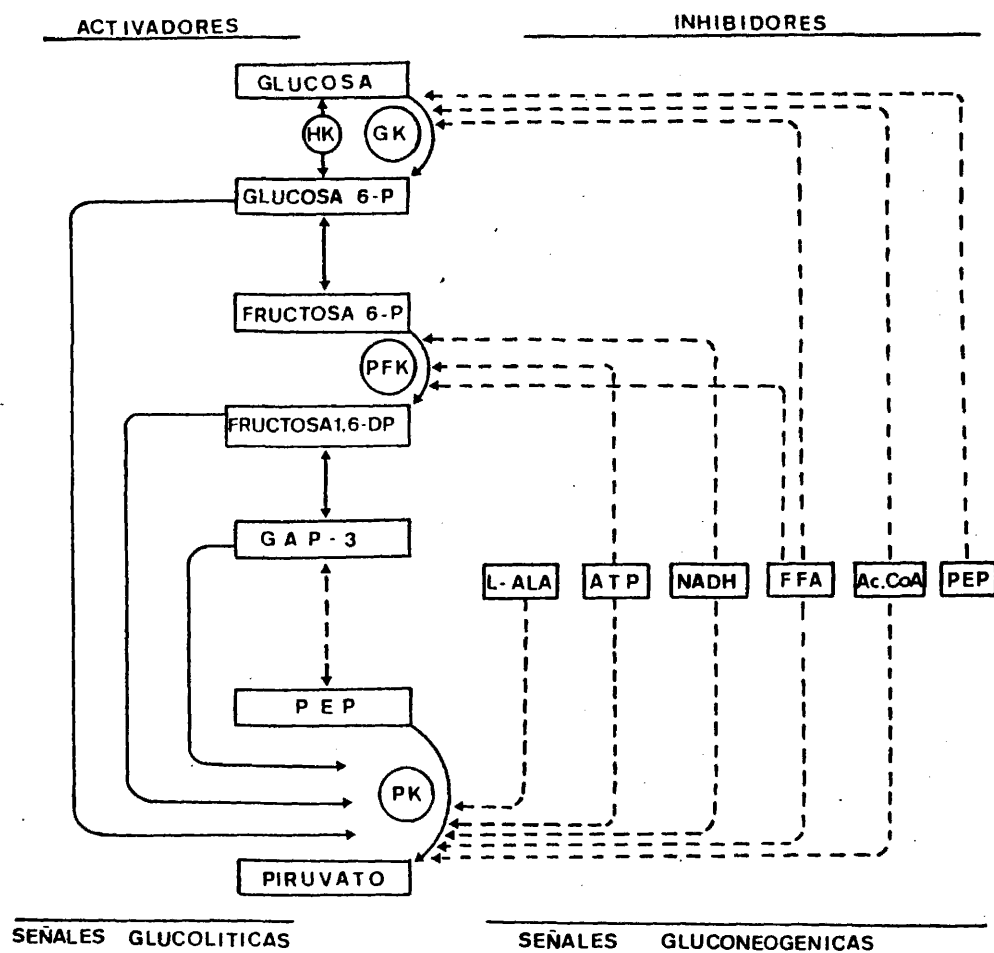
En el metabolismo degradativo de la glucosa los ácidos grasos libres pueden considerarse uno de los productos finales. Estos ácidos grasos son capaces de inhibir selectivamente los enzimas clave de la glucólisis y la producción de lactato (Weber y cols., 1966).

Reconociendo el hecho básico de que en las células hepáticas predominan según las condiciones nutricionales u hormonales, la glucólisis o la gluconeogénesis, Weber (1969) considera que cuando se activa una vía metabólica, la ruta opuesta debe quedar marcadamente disminuída con el objeto de evitar reciclajes no aprovechables. De esta forma, cuando funciona la glucólisis, como el ATP se utiliza en las reacciones primeras, el ADP producido es el que inhibe las fosfatasa opuestas, que catalizan las reacciones finales de producción de glucosa. El ATP es necesario para que actúen los enzimas que fosforilan la glucosa y la fructosa-6-fosfato. Sin embargo, el ATP es un producto en la formación de piruvato a partir del fosfoenolpiruvato, e inhibe el enzima que cataliza esta reacción, la piruvato cinasa. Existen, por tanto, reguladores específicos que activan una reacción enzimática en una vía e inhiben al enzima opuesto en la vía antagonista. Esta regulación recíproca se lleva a cabo por el AMP que ac-

tiva la fosfofructocinasa pero inhibe la fructosa difosfatasa; el acetil CoA que activa la piruvato carboxilasa e inhibe la piruvato cinasa; el GTP que activa la fosfoenolpiruvato carboxicinas e inhibe la piruvato cinasa. Investigaciones recientes, revisadas por Goldberg y cols., (1975) han demostrado que el AMP-c y el GMP-c son capaces de ejercer efectos reguladores a través de mecanismos antagónicos en diversos sistemas biológicos. La activación alostérica de la fosfogructocinasa de mamíferos por el AMP-c ha sido comunicada repetidas veces (Passg neau y Lowry, 1962; Mansour, 1963; Mansour, 1972) y su inhibición por GMP-c está siendo estudiada (Beitner y cols., 1977), por lo que existen pruebas evidentes en el sentido de que la fosfogructocinasa puede estar sometida a un mecanismo de control antagónico AMP-c y GMP-c como los enunciados anteriormente.

Existen además moléculas moduladoras que actúan modificando positiva o negativamente la actividad de un enzima unos pasos más allá de la secuencia metabólica. De esta forma, se sabe que la continuidad de la vía glucolítica en hígado depende de la actividad de la piruvato cinasa que está modulada a su vez por los niveles de glucosa-6-fosfato, fructosa difosfato y gliceraldehido fosfato, todos ellos activadores del enzima (ver figura de la página 28).

La gluconeogénesis, por otra parte, da lugar a la inhibición selectiva de los enzimas glucolíticos clave por efecto -



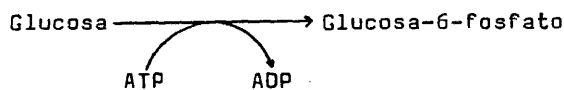
ACTIVADORES E INHIBIDORES SOBRE LOS ENZIMAS CLAVE DE LA GLUCOLISIS

de una elevación en la concentración de metabolitos que señalizan la función incrementada del organismo para el proceso - gluconeogénico en hígado. Tales señales son: el incremento de los acil CoA de cadena larga, que surgen en el hígado de procedencia periférica e inhiben la glucocinasa y la piruvato ci nasa; el NADH que inhibe la fosfofructocinasa y la piruvatoci nasa y la L-alanina y L-fenilalanina que inhiben competitiva- mente la piruvatocinasa. El acetil CoA por el contrario funciona activando la piruvato carboxilasa.

#### 2.3.1.1.- Enzimas clave de la glucólisis y su regulación:

##### Hexocinasas y Glucocinasa:

Como en otros tejidos, el primer paso limitante del metabolismo de la glucosa en hígado es su fosforilación a glucosa-6-fosfato.

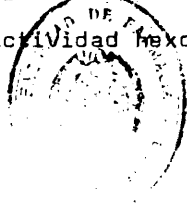


El enzima implicado en esta reacción es la hexocinasa, de la cual se conocen hasta cuatro isoenzimas. Tres de ellos tienen una elevada afinidad para la glucosa y una Km muy baja y operan cerca de las velocidades máximas a concentraciones 0,2 - 5 mM de glucosa, lo que corresponde a 36-90 mg./100 ml. Estas hexocinasas funcionan, por tanto, a saturación en el rango de las concentraciones fisiológicas de glucosa y su activi

dad no se incrementa en respuesta a niveles elevados de glucosa plasmática.

Desde 1960 diferentes grupos de investigadores (Sharma y cols., 1963; Salas y cols., 1963) han descrito la presencia de una glucocinasa en hígado de rata que tiene una afinidad baja por la glucosa, de 10 - 20 mM, lo que corresponde a 180-360 mg./100 ml. Este enzima es inducible, disminuye en casos de ayuno o diabetes aloxánica (figura de la página 28) y puede restaurarse su actividad mediante mecanismos en los que están implicados el RNA y la síntesis proteica (Sharma y cols., 1963). Los cambios en la actividad de la glucocinasa tienen lugar lentamente y los efectos de la deficiencia o administración de insulina requieren algún tiempo para manifestarse.

Sols y cols. (1964) postularon que la glucocinasa es exclusiva de las células del parénquima hepático y que las actividades hexocinásicas de los extractos hepáticos representan una contaminación con células no parenquimales. La evidencia de la existencia de más de una forma de ATP: Glucosa-6-fosfato transferasa, en extractos de hígado de rata, fué proporcionada por Walker (1962 y 1963), quien encontró que el isoenzima con Km elevada era muy adaptativo y disminuía significativamente en extractos hepáticos de ratas en ayuno y diabéticas. Sols. y cols. (1964) no pudieron confirmar la existencia de actividad glucocinasa residual en hígado de rata con diabetes aloxánica y atribuyeron esto a interferencias con la actividad hexocinasa.



Mediante técnicas de fraccionamiento de extractos de tejidos por cromatografía en columnas de DEAE celulosa (González y cols., 1964 y 1967; Grossbard y Schimke, 1966) y por electroforesis en gel de almidón (Katzen y Schimke, 1965; Hansen y cols. 1967; y McLean y Brown, 1966) se ha confirmado cinéticamente - la existencia de hexocinasas de alta y baja Km y además se ha resuelto el dilema sobre las Km de las hexocinasas procedentes de varias fuentes, las cuales fueron consecuencia de la diferente proporción de los isoenzimas en los diversos tejidos. - Los isoenzimas se designaron como tipos I al IV de acuerdo con sus velocidades de movilidad hacia el ánodo, siendo la tipo IV la más rápida (Katzen y Schimke, 1965).

En tejidos no hepáticos el isoenzima II es muy adaptativo y aparece tan sensible a la insulina como la glucocinasa (Shafma y cols., 1964).

El estudio cualitativo de los cambios adaptativos de las hexocinasas se ha llevado a cabo mediante separación electroforética sobre geles de almidón o sobre membranas de acetato de celulosa (Sato y cols., 1969). Por cálculo óptico de estos electroforogramas se obtuvieron los primeros resultados semicuantitativos. Las diferentes propiedades cinéticas de los 4 isoenzimas hexocinasas, unidas a su diferente estabilidad al calor (Grossbard y Schimke, 1966) ha hecho posible calcular cuantitativamente cada uno de los cuatro isoenzimas por separado, a partir de extractos crudos de tejido hepático. Gumaa y



McLean (1972) han estudiado cuantitativamente estos cuatro - isoenzimas. El uso de fructosa para el ensayo de la hexocinasa total (E.C. 2.7.1.1.), tiene mayores ventajas que el uso de glucosa ya que la Km para la fructosa es casi idéntica para los tres isoenzimas.

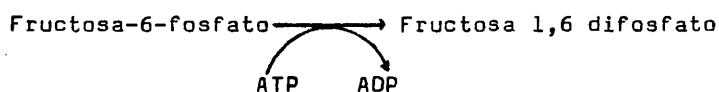
Gumaa y McLean (1972) han encontrado que la glucocinasa (E.C.2.7.1.2) no es exclusiva del hepatocito (Sols y cols., 1964), lo que implica que el gen correspondiente puede ser - tan común como el de la hexocinasa. La elevada actividad glucocinasa del tejido hepático puede ser un reflejo de la elevada concentración intracelular de glucosa bajo condiciones de suministro adecuado de insulina. Considerando que los hepatocitos son prácticamente permeables a la glucosa (Cahill y cols., 1958), la concentración intracelular de glucosa alcanzará una cifra de 20 mM en el período postprandial, mientras que en tejidos no hepáticos, con limitada permeabilidad a la glucosa, esta concentración representaría tan sólo una fracción de la del fluido extracelular (England y Randle, 1967); por todo ello, incluso con suficiente disponibilidad de insulina, las velocidades de síntesis de glucocinasa son menores. Esto concuerda con Sato y cols., (1969) quienes apoyan la idea de que cuando la actividad glucocinasa no puede ser detectada esto se debe a una falta de expresión y no a la delección del gen implicado.

En hígado de rata la glucocinasa está presente en los hepa

tocitos y las otras hexocinasas aparecen principalmente en tejido no parenquimatosos (Sapag-Hagar, Marco y cols., 1969), - habiendo sido comunicada más recientemente (Katz y cols., 1976) una distribución heterogénea en las zonas periportales del hígado de rata. De acuerdo con estas observaciones Shatton y cols., (1969) investigaron estas enzimas en hepatomas de diversos grados de diferenciación. En hepatomas bien diferenciados los niveles de glucocinasa fueron normales y la actividad hexocinasa - fué baja; mientras que en tumores poco diferenciados aparecieron niveles elevados de las tres hexocinasas y no mostraron actividades glucocinasa.

#### Fosfofructocinasa:

La fosfofructocinasa cataliza el segundo eslabón irreversible de la glucólisis, según la reacción:



La mayor parte de los estudios sobre fosfofructocinasa - (ATP-fructosa-6-fosfato:1-fosfotransferasa) han sido llevados a cabo con extractos de tejidos glucolíticos de mamíferos, como músculo y cerebro (Mansour, 1972). Así, se han obtenido - cristalizadas al menos los enzimas de músculo de conejo (Parmeggiani y Krebs., 1965) y corazón de carnero (Mansour y cols., 1965) entre otros.

Las cinéticas alostéricas y regulación de la fosfofructo-  
cinasa de corazón, han sido estudiadas por Martensen y Mansour  
(1976) empleando el análogo fructosa 6 sulfato, y caracterizan  
do el efecto de ligandos alostéricos sobre las Km para el sus-  
trato. Wolfan y Hames (1977) han conseguido establecer la dis-  
tancia (40 Å) entre el sitio del citrato y el grupo sulfhidrilo  
más reactivo del enzima, empleando técnicas de fluorescencia -  
para medir transferencias de carga desde el donador (piridoxal-  
5-fosfato) colocado en el sitio del citrato, hasta el aceptor,  
situado en el sulfhidrilo más reactivo (Lad y cols., 1977).

Por otro lado, se han puesto de manifiesto grandes diferen-  
cias en las propiedades físicoquímicas de los enzimas proceden-  
tes de tejidos glucolíticos (músculo) y gluconeogénicos (riñón)  
(Johnson y cols., 1976). Las propiedades de este enzima en te-  
jidos gluconeogénicos como el hígado o el riñón han sido rela-  
tivamente desconocidas (Brock, 1969; Kemp, 1971; Ramaiah y  
cols., 1970; Clark y cols., 1974). Brand y Söling (1974) han -  
conseguido purificar hasta homogeneidad el enzima de hígado de  
rata, aportando información sobre su mecanismo de reacción. El  
enzima es un tetramero de peso molecular 325.000, similar al  
múscular, que tiene cuatro protómeros de peso molecular 82.000.  
Los estudios cinéticos proporcionan fuertes evidencias en fa-  
vor de un mecanismo ordenado BiBi, según Cleland (1963).

Trujillo y Deal (1977) han puesto de manifiesto que la -  
fosfofructocinasa de hígado de cerdo es mayor que cualquier -

otra estudiada, estimando un peso molecular de  $10 \times 10^6$  a una concentración de proteína de 5 mg./ml., y caracterizándolo como muy asimétrico en función de sus propiedades, coeficiente de difusión y viscosidad intrínseca, proponiendo pruebas de un rápido equilibrio asociación-disociación, de potencial interés regulador.

Paralelamente Dunaway y Weber (1974)<sub>a</sub> desarrollaron un procedimiento de identificación de isoenzimas, caracterizando dos como  $L_1$  y  $L_2$ , siendo el  $L_2$  el predominante en hígado de rata (85% de la actividad total) y comportándose como más aniónico que el  $L_1$ . El peso molecular del isoenzima  $L_2$  es 250-300.000 siendo un tetrámero compuesto por 4 protómeros de idéntico tamaño y peso molecular (65.000). Por otro lado los isoenzimas  $L_1$  y  $L_2$  son diferentes cinéticamente. Así la afinidad de  $L_2$  por fructosa-6-fosfato es sensible a la concentración de ATP, mientras que la afinidad de  $L_1$  no lo es.

Sin embargo, la afinidad de ambos isoenzimas para la fructosa-6-fosfato es dependiente del AMP o  $NH_4^+$ , aunque  $L_1$  es menos sensible en este aspecto. La inhibición por el ATP de  $L_2$  es dependiente de la concentración de fructosa-6-fosfato así como de la presencia de AMP ó  $NH_4^+$ . La inhibición por ATP del isoenzima  $L_1$  es menos severa que en el  $L_2$ , al igual que la inhibición por citrato.

Dunaway y Weber (1974 b) han analizado a su vez los efectos hormonales y cambios nutricionales sobre la síntesis y



degradación de isoenzimas hepáticos de la fosfofructocinasa. El trabajo, demuestra que sólo el isoenzima mayoritario en hígado ( $L_2$ ) es sensible a estímulos hormonales y nutricionales, mientras que el isoenzima minoritario ( $L_1$ ) no es afectado significativamente por el ayuno o la administración de insulina.

La regulación de la actividad fosfofructocinasa ha sido objeto de numerosas investigaciones, que han puesto de manifiesto su papel central en la regulación de la glucólisis y su integración con la respiración, mediante el efecto Pasteur. La relación entre la actividad fosfofructocinasa y el efecto Pasteur fué inicialmente establecida por Passoneau y Lowry (1962) y también por los mismos autores (1963) su relación con el ciclo del ácido cítrico postulándose un nuevo sitio inhibidor para el ATP sobre el enzima, que fué identificado por Viñuela y cols. (1963). Existen excelentes revisiones al respecto (Sols, 1976; Krebs, 1972; Engelhardt, 1974 y Racker, 1974). La actividad del enzima "in vitro" está influenciada por múltiples efectos, a cuyas acciones sinérgicas se atribuyen los grandes cambios apreciados en la activación de la glucólisis (Bloxham y Lardi, 1973). Existen aportaciones más recientes al control de las fosfofructocinasas de músculo de rata (Tornheim y Lowenstein 1976), conejo (Barzu y cols., 1977), levadura (Bañuelos y cols., 1977), eritrocito humano (en fenómenos de disociación-reasociación) (Wenzel y cols., 1977).

1976) y tejido nervioso (Newsholme, 1973). El posible papel regulador del GMP, antagonizando la acción estimuladora del AMP-c, ha sido analizado por Beitner y cols., (1977).

A pesar de la ingente cantidad de información acumulada aún no está clara la importancia relativa de la regulación alostérica de la fosfofructocinasa en condiciones fisiológicas. Brand y Söling (1974) han propuesto un mecanismo de regulación basado en el aumento o disminución de proteína activa, o más directamente en procesos de fosforilación-desfosforilación, en los que la proteína es activada por fosforilación, dependiente de una cinasa, de un resto de serina, e inactivada por desfosforilación, dependiente de una fosfatasa, seguida de una desagregación. Estos mismos autores (Brand y cols., 1976) han demostrado posteriormente la interconversión de formas activas e inactivas "in vivo" e "in vitro". Posteriormente Hussey y cols. (1977) han comunicado el aislamiento de fracciones de fosfofructocinasa diferencialmente fosforiladas a partir de músculo de conejo, lo que parece conceder al mecanismo propuesto por Söling y cols., (1973), una validez más general.

#### Piruvatocinasa:

La piruvatocinasa cataliza el tercer paso irreversible de la glucólisis, según la reacción:



Ha sido posible identificar al menos tres tipos de isoenzimas en tejidos de mamíferos, bien por técnicas electroforéticas de mamíferos, bien por técnicas electroforéticas (Susor y Rutter, 1968; Imamura y Tanaka, 1972) o inmunológicas (Imamura y cols., 1972). El isoenzima L, propio del hígado, el isoenzima M, propio del músculo y cerebro y el A, descubierto por primera vez en tejido adiposo (Marco y cols., 1971). Mientras que los isoenzimas L y A son regulables, por encontrarse en hígado y riñón, órganos que deben presentar un ajuste muy fino entre los flujos glucolíticos y gluconeogénicos, el M no lo es, posiblemente porque en el músculo la función que predomina es la glucólisis (Carbonell y cols., 1973).

El isoenzima L ha sido purificado hasta homogeneidad por diversos laboratorios, a partir de hígado de rata (Ljungström y cols., 1974; Riou y cols., 1978), hígado de pollo (Eigensbrodt y Schoner, 1977) e hígado de cerdo (Ljungström y cols., 1976). También han sido purificados hasta homogeneidad, el enzima de eritrocito (Marie y cols., 1977) y el isoenzima A, a partir de riñón de cerdo (Berglund y cols., 1977).

Las propiedades cinéticas y reguladoras de estos tres isoenzimas han sido estudiadas repetidas veces (Llorente y cols., 1970; Carbonell y cols., 1973) dando énfasis a sus marcadas propiedades alostéricas. Son fuertemente inhibidos por el ATP, l-alanina, l-fenilalanina y l-cisteína, siendo la cisteína el inhibidor más potente del isoenzima L, mien-

tras que la fenilalanina lo es del A. La fructosa 1-6-difosfato es un estimulador tanto del isoenzima L como del A. El isoenzima M no es sensible a estos efectos.

El mecanismo de la reacción propuesta por McFarlane y Ainsworth (1974) transcurre por fosforilación del enzima, durante la transferencia de fosfato desde el fosfoenolpiruvato al ADP, puesto que muestra una cinética de estado estacionario típica de un mecanismo Ping-Pong a pH 6,2. Por otro lado, Dann y Britton., (1977) han presentado pruebas evidentes en contra de la formación del fosfoenzima propuesto inicialmente.

La mayor parte de los estudios de regulación se han encaminado a estudiar la inhibición del enzima en condiciones gluconeogénicas. Como es sabido, en ayuno, en diabetes o en dietas ricas en lípidos, se produce una redistribución tanto de metabolitos como de actividades enzimáticas (Greenbaum y cols. 1971)<sup>b</sup>, que conducen a una marcada caída en la actividad de los enzimas glucolíticos y a una estimulación de las actividades gluconeogénicas. Este fenómeno produce una inhibición en la piruvato cinasa y un aumento en la actividad de los enzimas gluconeogénicos: Piruvato carboxilasa y fosfoenolpiruvato carboxicinasas.

Se han observado alteraciones en las propiedades cinéticas de la piruvatocinasa en respuesta a la administración de glucagón en hígado de rata (Blair y cols., 1976; Tauton y cols., 1972) y en hepatocitos aislados (Riou y cols., 1976; Feliu y



cols., 1976). La administración de glucagón conduce a un descenso en el nivel de actividad de la piruvatocinasa. Como la administración de glucagón produce un aumento en el nivel de AMP cíclico, que podría activar una protein cinasa, se postuló la existencia de un mecanismo de fosforilación-desfosforilación, implicado en la regulación del enzima "in vivo", demostrando inicialmente que este mecanismo es operativo "in vitro" (Ljungström y cols., 1974). Esta hipótesis fue reforzada experimentalmente cuando Tauton y cols., (1972 y 1974) observaron un rápido incremento en la concentración de AMP cíclico y un rápido descenso en la actividad del enzima después de una inyección de glucagón. Ljungström y cols., (1976) han puesto de manifiesto a su vez fuertes diferencias cinéticas entre el enzima libre y el fosforilado, citando como efecto predominante de la fosforilación una reducción en la afinidad para el sustrato fosfoenolpiruvato, pasando de  $K_{0,5} = 0,3$  a  $K_{0,5} = 0,9$  mM en el enzima fosforilado, un aumento en el efecto cooperativo con el fosfoenolpiruvato, aumentando el número de Hill  $n_H$  desde 1,1 a 1,5 y permaneciendo la  $V_{max}$  inalterada. Los cambios en actividad ocurren en paralelo con el proceso de fosforilación.

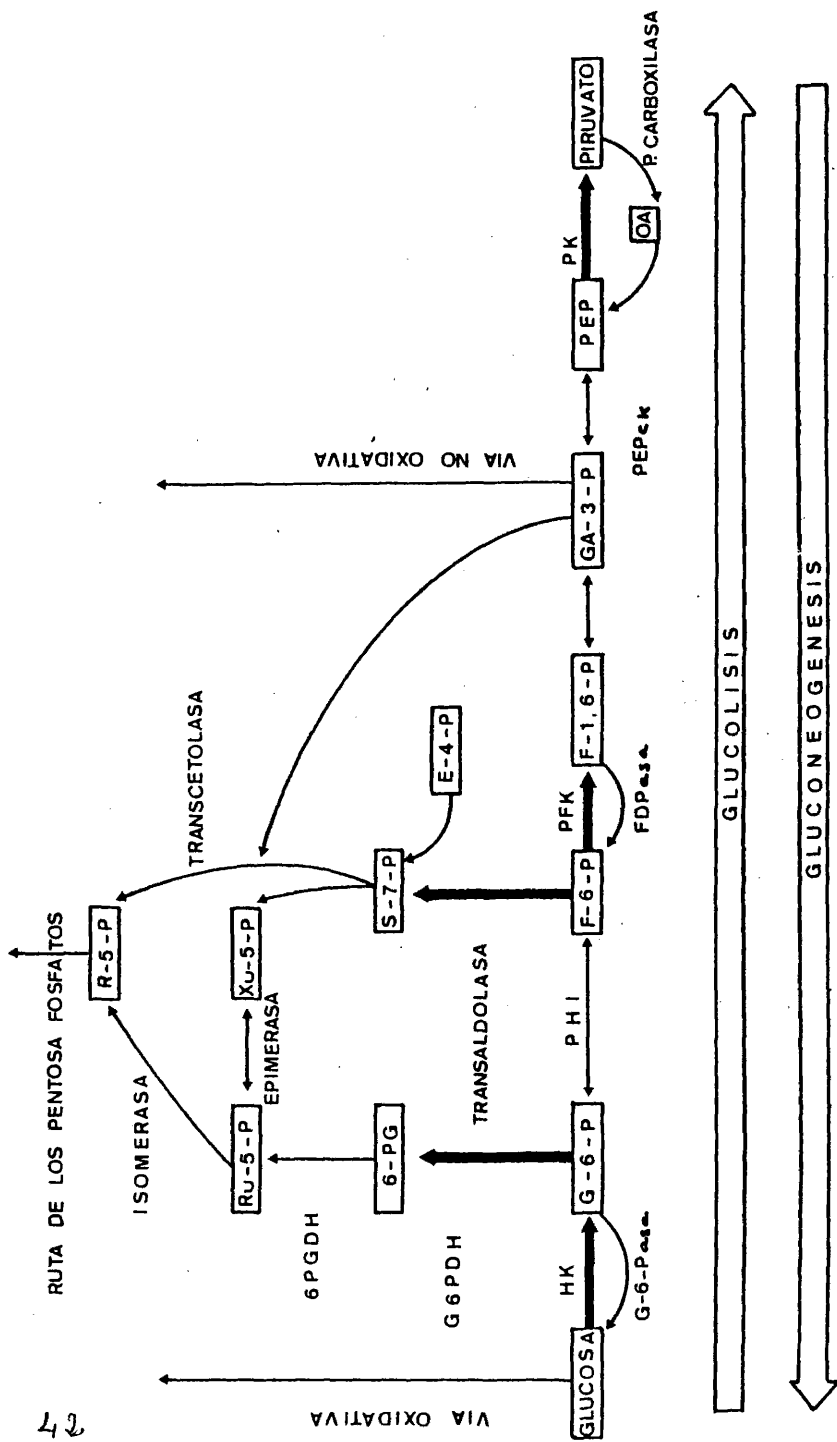
Kohl y Cottam (1977) han intentado corroborar esta hipótesis "in vivo", demostrando la presencia de dos tipos diferentes de piruvato cinasa L, según que el hígado de patilla se encuentre en situación gluconeogénica o no. Estos dos tipos varían en algunas de sus propiedades cinéticas, como la

$K_{0,5}$  para el fosfoenolpiruvato que oscila desde 0,96 mM para el enzima encontrado en ratas alimentadas con dieta alta en carbohidratos hasta 1,6 mM en el enzima aislado del hígado - de ratas en ayunas. Estas diferencias concuerdan con las encontradas para el enzima no fosforilado y fosforilado.

Por último Riou y cols., (1978) han comunicado el aislamiento del enzima fosforilado (marcado con  $P^{32}$ ), después de una inyección de glucagón, a partir de hígado de rata, demostrando el funcionamiento de este mecanismo "in vivo". Este mecanismo de fosforilación-desfosforilación viene a unirse a los anteriormente citados, aportando una nueva luz al proceso de regulación en un punto tan crucial en la integración - de las reacciones glucolíticas y gluconeogénicas.

#### 2.3.2.- Ciclo de los pentosa-fosfatos:

El descubrimiento en el año 1931 por Warburg y Christian de la oxidación de la glucosa-6-fosfato en hemolizados de glóbulos rojos de caballo, hizo que se aceptara la existencia de una nueva ruta metabólica para la oxidación directa de la glucosa, que operase como vía alternante con el mecanismo glucolítico de Embden-Meyerhof. Posteriores estudios de Warburg y cols., (1935) demostraron que el 6-fosfogluconato originado por la oxidación de la glucosa-6-fosfato, era fermentado en extractos de levadura. Lippmann observó un año después (1936) el carácter oxidativo de esta reacción. Warburg y Christian -

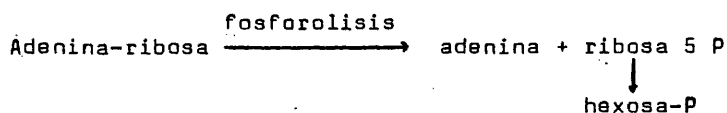


SISTEMAS METABOLICOS IMPLICADOS EN LA SINTESIS Y DEGRADACION DE GLUCOSA EN HIGADO DE RATA.

(1937) y también Dickens (1938) confirmaron la descarboxilación oxidativa del 6-fosfogluconato con formación de una pentosa-fosfato.

Hasta aquí puede decirse que el eslabón oxidativo del ciclo de los pentosa fosfatos estaba casi totalmente esclarecido, sólo quedaba identificar la pentosa fosfato formada. Fué en 1951 cuando Horecker y cols., demostraron que era la Rubinosa-5-fosfato la cetopentosa originada directamente por descarboxilación oxidativa del 6-fosfogluconato.

La primera evidencia de la existencia del eslabón no oxidativo de la vía de los pentosa fosfatos fué observada por - Dische (1938) al demostrar la formación de hexosafosfato a - partir de hemolizados de glóbulos rojos incubados con adenosina, y postuló que la fosforólisis de la adenosina daba lugar a ribosa-5-fosfato y que este compuesto originaba posteriormente hexosafosfato.



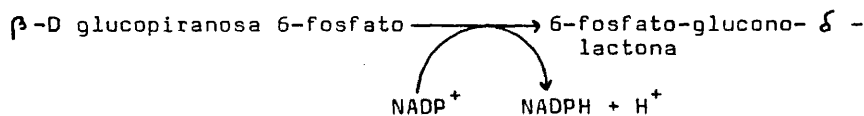
Waldvogel y Slenk (1947) comprobaron la formación de hexosa-fosfato y triosafosfato a partir de pentosafosfato.

En el descubrimiento de las actividades enzimáticas impli cadas en la transformación de pentosa en hexosa intervinieron dos grupos de investigadores, uno encabezado por Horecker y - otro por Racker. Cuando todas estas reacciones se consideraron

juntas se llegó al conocimiento de la existencia de un nuevo ciclo metabólico mediante el cual la glucosa-6-fosfato se - convierte en pentosa fosfato y a partir de ésta se regenera la hexosafosfato por acción de las reacciones de transferencia no oxidativas y la intervención de una isomerasa y una - epimerasa apropiadas (figura de la página 42). La existencia de este ciclo fué experimentalmente demostrada por Couri y - Racker (1959) mediante sistemas enzimáticos reconstituídos a partir de preparaciones libres de células.

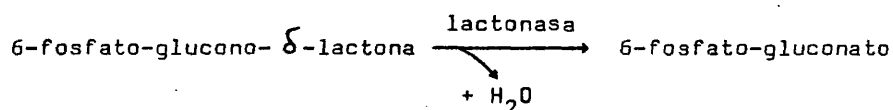
#### 2.3.2.1.- Segmento oxidativo del ciclo de los pentosa-fosfa- tos. Regulación:

La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, el primer enzima - del ciclo fué descubierto en eritrocitos por Warburg y Chris- tian (1931) y cataliza la deshidrogenación de la  $\beta$ -D gluco- piranosa 6-fosfato dando origen a la 6-fosfoglucono-  $\delta$  -lac- tona (Cori y Lippmann, 1952), según la reacción:



La 6-fosfato gluconolactona formada por la deshidrogenasa de la glucosa-6-fosfato, necesita ser hidrolizada para dar lu gar al 6-fosfato-gluconato, sustrato de la segunda deshidroge nasa del segmento oxidativo del ciclo de los pentosa fosfatos. Como la hidrólisis espontánea del anillo  $\delta$ -lactónico a pH -

neutro es lenta, se postuló la existencia de una lactonasa - (Horecker, 1953). Esta lactonasa fué posteriormente descrita por Brodie y Lippmann (1955) como específica para la lactona del 6-fosfato-gluconato.



Warburg y Christian (1936 y 1937) y Dickens (1936 y 1938) demostraron independientemente que el 6-fosfato-gluconato sufría una descarboxilación oxidativa, catalizada enzimáticamente, que daba lugar a una pentosa fosfato y a  $\text{CO}_2$ .

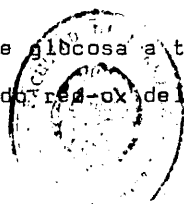
La reacción oxidativa requería  $\text{NADP}^+$  y el enzima que la catalizaba, se denominó 6-fosfogluconato deshidrogenasa. Algunos años más tarde se identificó el producto de la reacción - como ribulosa-5-fosfato (Horecker, 1951).



la reacción es reversible pero su equilibrio está fuertemente desplazado hacia la formación de pentosa.

#### Regulación.

El factor principal que controla el flujo de glucosa a través del ciclo de los pentosa fosfato es el estado red-ox del -



sistema NADP/NAOPH determinado mayoritariamente por la velocidad de la lipogénesis.

La relación NADP/NAOPH del compartimento citosólico ha sido calculada por diversos procedimientos (ver apartado 2.3.3.), principalmente a partir de las concentraciones de los sustratos y la constante de equilibrio del enzima málico (malato - deshidrogenasa descarboxilante E.C. 1.1.1.40) (Gumaa y McLean 1971).

Estos mismos autores han observado que el estado red-ox - del sistema NADP/NAOPH regula el flujo de glucosa a través de las dos deshidrogenasas del segmento oxidativo del ciclo. Teperman y Teperman (1958), Glock y McLean (1955), Fitch y cols. (1959), comunicaron que las concentraciones de ambas deshidrogenasas cambian drásticamente en hígado según el estado nutricional y hormonal del animal. El cociente NADP/NAOPH presenta a su vez importantes cambios bajo estas condiciones (Greenbaum y cols., 1971<sup>b</sup>, Veech y cols., 1970).

Por otro lado, la adición de aceptores de electrones como el metasulfato de fenazina o azul de metileno, que son capaces de oxidar "in vitro" el NAOPH, incrementan "in vivo" la utilización de glucosa a través del ciclo (Cahill y cols., 1958)<sup>b</sup> - Todas estas evidencias refuerzan la hipótesis de que la velocidad de oxidación de las hexosas monofosfato está íntimamente relacionada con la velocidad de todos aquellos procesos que consumen NAOPH (Sapag-Hagar y cols., 1973; Eggleston y Krebs, 1974).

Holten y cols. (1976) han calculado la capacidad de la - glucosa-6-fosfato y 6-fosfogluconato deshidrogenasas para - producir NADPH en diferentes estados nutricionales. La capacidad máxima del hígado para sintetizar ácidos grasos es de 0,12  $\mu$ moles/gramo hígado/minuto Windmueller y Spaeth, 1966). Kornacker y cols., 1965, han estimado en tejido adiposo que aproximadamente la mitad del NADPH requerido para la síntesis de ácidos grasos se deriva del ciclo de los pentosa fosfatos, mientras que el resto lo hace a partir del enzima málico. Suponiendo que el 50% de las 14 moléculas de NADPH requeridas - para la síntesis de una molécula de ácido palmítico procede - de las deshidrogenasas del ciclo de las pentosas, éste debería aportar 0,84  $\mu$ moles de NADPH/minuto/gramo hígado.

Dado que a las concentraciones fisiológicas de NADPH las - dos deshidrogenasas se encuentran completamente inhibidas, era necesario encontrar una explicación al hecho de que tuviera lugar la síntesis de ácidos grasos en condiciones en las que no era posible el funcionamiento del segmento oxidativo del ciclo de los pentosa fosfatos.

El descubrimiento por Eggleston y Krebs (1974) de que el - glutatión oxidado podría contrarrestar la inhibición de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa por el NADPH, permitió dar una - explicación razonable al mecanismo que podría actuar "in vivo", para incrementar la actividad de ambas enzimas.

Sapag-Hagar y cols., (1973) han observado que existe un -





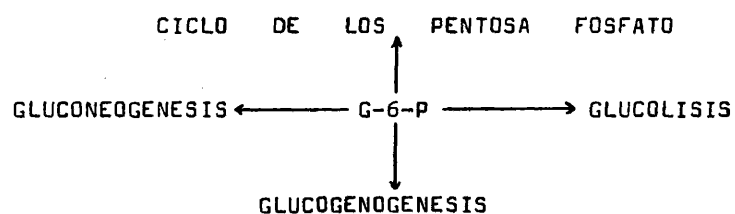
desequilibrio "in vivo" entre los niveles del par  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  en hígado de rata y el cociente entre las actividades de ambas deshidrogenasas (6-fosfato gluconato deshidrogenasa/glucosa-6-fosfato deshidrogenasa). En condiciones lipogénicas, este último da valores de 0,01, mientras que en condiciones normales es aproximadamente 2.

Todos estos resultados muestran que la regulación del segmento oxidativo del ciclo ofrece aún problemas a la hora de explicar su comportamiento "in vivo". Rodríguez Segade y cols., (1978) han estudiado el funcionamiento de estas deshidrogenasas en hepatopáncreas de mejillón, llegando a la conclusión de que la regulación "in vivo" de estos enzimas no sólo implica la desinhibición de las deshidrogenasas sino la concentración intracelular de sustratos e iones inorgánicos.

El porcentaje de contribución del ciclo al catabolismo total de la glucosa ha sido estudiado por Baquer y cols. (1973), estableciéndolo en un 30% para la glándula mamaria y tejido adiposo y en un 16% para el hígado. Esta menor contribución del ciclo de las pentosas fosfato se debe, sin duda, al estrecho control a que están sometidos los enzimas iniciales, principalmente por el estado del par  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  (Noltman y Kuby, 1963; Neglein y Haas, 1935), el nivel de acil-CoA de cadena larga (Eger-Neufeldt, 1965) y la situación endocrina general.

Sólo estas influencias reguladoras explicarían el que, aunque la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa es el enzima que pre-

senta una Km menor para la glucosa-6-fosfato entre los otros tres que compiten con ella por el sustrato (fosfoglucosa isomerasa, glucosa-6-fosfatasa, fosfoglucosa mutasa), no sea el que aproveche mayoritariamente el "pool" de sustrato.



#### 2.4.- Metabolismo lipídico en hígado.

El hígado interviene activamente en el metabolismo de los lípidos, siendo el contenido promedio de lípidos en este órgano, en la mayor parte de los animales superiores, de un 5%. - Este contenido depende de la dieta del animal y de la presencia o ausencia de cierto número de factores.

La vía que utiliza el hígado para la síntesis de triglicéridos es similar a la del tejido adiposo. El proceso requiere un sistema ATP dependiente para activar los ácidos grasos a - acil-CoA de cadena larga y una fuente de  $\alpha$ -glicerofosfato. El proceso de esterificación tiene lugar en los microsomas y en la mitocondria (Hyams y cols., 1966).

Los triglicéridos pueden ser almacenados como combustible potencial en el tejido adiposo, pero no pueden almacenarse en altas concentraciones en hígado sin consecuencias graves de - lesión hepática.

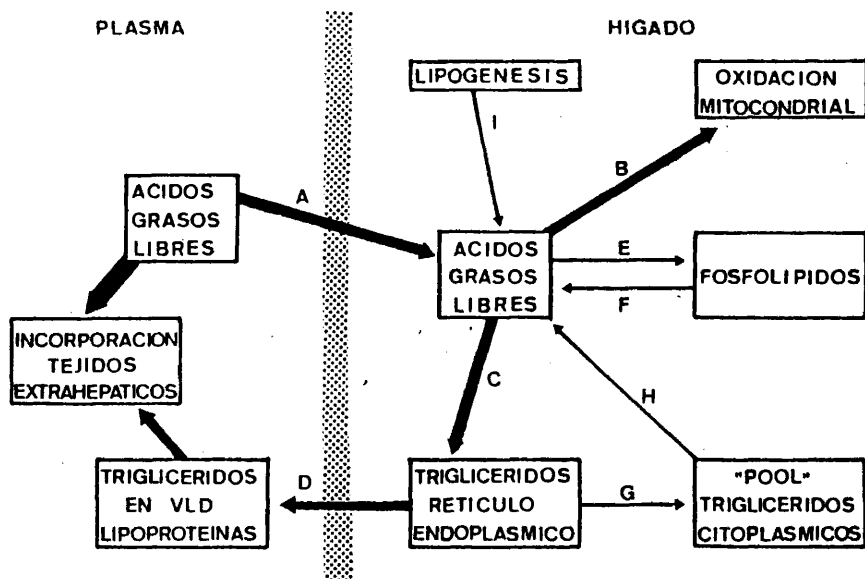
Los lípidos movilizados a partir del tejido adiposo, dieta, etc, son transportados por el torrente circulatorio. Aproximadamente 1/3 de estos ácidos grasos en animales en reposo, son incorporados por el hígado (Scow y Chernick, 1970).

En condiciones normales los ácidos grasos plasmáticos que entran en el hígado son en un 50% incorporados en triglicéridos, un 25% en fosfolípidos y cantidades más pequeñas en interés del colesterol. Los ácidos grasos esterificados en el -

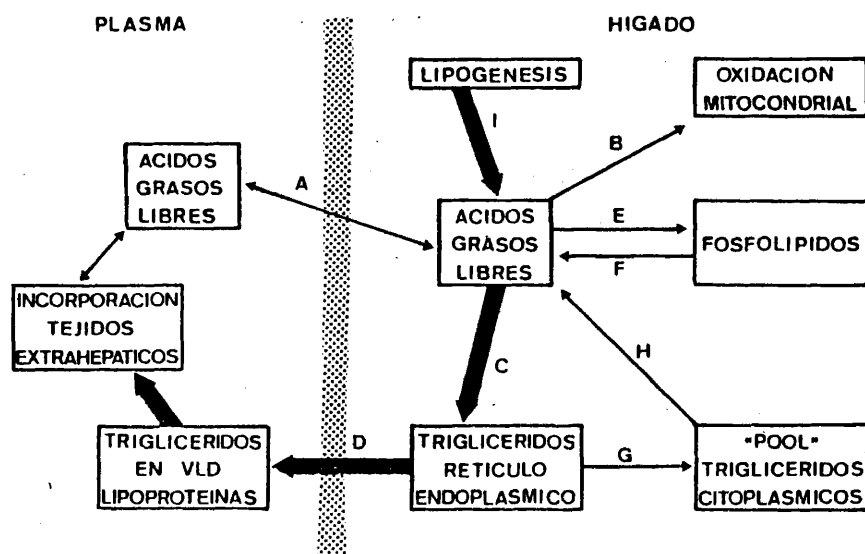
hígado se incorporan a los elementos estructurales de la célula, se segregan al plasma en forma de lipoproteínas o se almacenan como gotas lipídicas en el citoplasma.

Los ácidos grasos se sintetizan en hígado cuando la dieta es rica en carbohidratos y pobre en lípidos (dieta lipogénica). En estado de ayuno el flujo de ácidos grasos a través del hígado se muestra en el esquema (I) de la página 52. Aproximadamente 1/3 de los ácidos grasos del plasma, que proceden del tejido adiposo, se incorporan normalmente al hígado, en estado de reposo (ruta A) y una vez dentro del hígado bien se oxidan (ruta B) o se esterifican en el retículo endoplásmico (ruta C), liberándose posteriormente al plasma como triglicéridos en forma de VLD lipoproteínas (ruta D). La lipogénesis hepática es mínima en estado de ayuno.

En estado lipogénico la movilización de ácidos grasos a partir del tejido adiposo es mínima y la concentración plasmática de ácidos grasos es pequeña. En estos casos aunque el "pool" de ácidos grasos libres puede variar libremente, la incorporación neta de ácidos grasos por parte del hígado parece obvio que sea pequeña. Por otra parte, si la dieta es elevada en carbohidratos y pobre en grasa, la velocidad de lipogénesis tiene que incrementar (Jansen, 1968), mientras que la velocidad de oxidación de ácidos grasos será menor (Mayes y Felts, 1967). De esta forma el modelo de flujo de ácidos grasos que se muestra en el esquema (I) de la página 52 para el estado



I.-REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL FLUJO DE ACIDOS GRASOS EN HIGADO EN ESTADO DE AYUNO.



II.-REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL FLUJO DE ACIDOS GRASOS EN HIGADO EN ESTADO DE DIETA LIPOGENICA.

de ayuno tiene necesariamente que ser diferente al esquema II para la dieta lipogénica. Los ácidos grasos sintetizados a partir de los carbohidratos de la dieta (ruta I) sustituirán en gran medida a la incorporación de los ácidos grasos plasmáticos (ruta A), y la oxidación de los ácidos grasos (ruta B) estará también reducida. Si consideramos que el hígado es la principal fuente de triglicéridos en animales con dietas pobres en grasa, los ácidos grasos por él sintetizados serán los principales suministradores de triglicéridos (rutas C y D).

En casos de dietas ricas en grasa, como ocurre en muchos casos con la humana, la reducción de la lipogénesis es muy marcada. Bajo tales condiciones el principal suministro de ácidos grasos al hígado es la dieta. Algunos ácidos grasos de la dieta pueden directamente entrar en el hígado vía vena porta (Jonhston, 1969). De mayor significación, sin embargo, es la posibilidad de que algún ácido graso de los triglicéridos del quilomicron sea incorporado por el hígado a partir de la sangre. Una porción de estos ácidos grasos podría ser segregada en el plasma en los triglicéridos de las VLD lipoproteínas. Tal ciclización de una fracción de los ácidos grasos de la dieta a través del hígado no representaría una liberación neta de triglicéridos hepáticos sino más bien permitiría una selección de ácidos grasos poliinsaturados, presentes en la dieta, para la incorporación en los fosfolípidos y en los ésteres del colesterol del plasma e hígado.

La lipogénesis hepática experimenta también notables variaciones con los diferentes estados del desarrollo. Por ejemplo, la lipogénesis es prácticamente nula cuando la dieta es extremadamente rica en grasa como ocurre en la lactancia (Ballard y Hanson, 1967; Taylor y cols., 1967).

En diversas condiciones especiales como pueden ser la - inyección de ácido nicotínico, clorpropamida o salicilato - en humanos, produce la inhibición de la movilización y la - reducción de la concentración plasmática de triglicéridos - (Yokoama y Zilversmit, 1965). Este último efecto es más fácilmente explicable en términos de una disminución en la salida de los triglicéridos hepáticos posterior a una incorporación hepática reducida de ácidos grasos. La administración de  $CCl_4$ , etionina, ácido orótico o puromicina a animales de experimentación, produjo una disminución en la concentración de triglicéridos plasmáticos y una elevación del contenido hepático de triglicéridos con el desarrollo eventual de un hígado graso. Tales efectos son debidos probablemente al resultado de la inhibición de la salida de <sup>triglicéidos</sup> hepáticos debida a un bloqueo en la formación de lipoproteínas plasmáticas. Los hígados grasos producidos por deficiencia de colina (Haines, 1966) Lombardi y cols., 1968), deficiencia de aminoácidos como también aquellos producidos por mal nutrición proteica y cirrosis avanzada en humanos, puede - también ser sobre una base similar.

El hígado graso producido por administración de etanol en animales de experimentación parece probable, por otro lado, que es el resultado de una formación incrementada de triglicéridos hepáticos (Shapiro, 1967) (Robinson, 1970).

#### Mecanismos que controlan la síntesis de triglicéridos.

Los triglicéridos en los depósitos grasos están en un estado dinámico. Su síntesis y deposición como combustible están favorecidas por la alimentación, la cual induce un estado de hiperinsulinismo. Se ha observado que el depósito de grasa almacenada se asemeja a la grasa de la dieta si la ingestión de grasa se mantiene a un alto nivel y por un periodo de tiempo bastante largo (Haessler y J.D. Crawford, 1965).

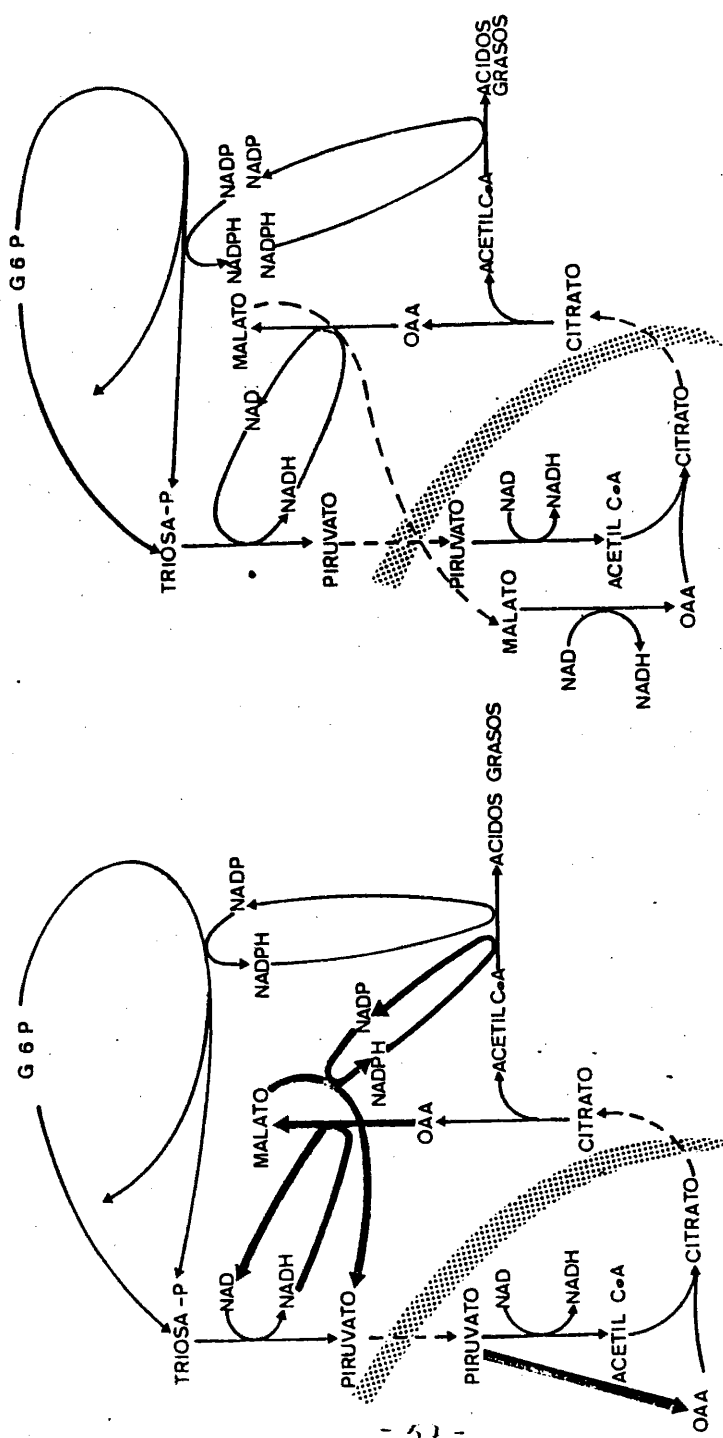
Las hormonas afectan la lipogénesis. La insulina se sabe que incrementa la síntesis de ácidos grasos y la de triglicéridos. Una de las acciones más importante de la insulina es incrementar la permeabilidad de los tejidos a la glucosa con lo que se estimula la glucólisis y el ciclo de los pentosa fosfatos; la glucólisis proporciona el acetil CoA y el  $\alpha$ -glucerofosfato y el ciclo de los pentosa fosfatos suministra NADPH. El incremento del ciclo tricarboxílico producirá ATP a mayor velocidad. Un análisis teórico del metabolismo energético asociado con la conversión de glucosa en grasa (Flatt,



1970) demuestra que este proceso es generador de energía y está limitado por la capacidad del tejido para utilizar los enlaces energéticos producidos en exceso durante este proceso.

Los ácidos grasos pueden controlar la conversión de glucosa en grasa en tejido adiposo en virtud que son excelentes sustratos para producción de energía más bien que por inhibición de enzimas específicos.

La segunda acción de la insulina puede encontrarse a nivel genético, ya que su administración se ha demostrado que incrementa la actividad de ciertos enzimas como la acetil-CoA carboxilasa (EC 6.4.2.1), la citrato liasa ATP dependiente (EC 4.1.3.8) además de las actividades glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (EC 1.1.1.49) y 6-fosfogluconato deshidrogenasa (EC 1.1.1.44) que proporciona el NADPH necesario para la síntesis de ácidos grasos. La velocidad de producción de NADPH puede actuar como fuerza conductora y de control en la síntesis de ácidos grasos a partir de acetato. Este problema discutido por Flatt (1970) quien ha llegado a la conclusión de que la producción de NADPH en el ciclo de los pentosa fosfatos puede suministrar sólo la mitad del NADPH requerido para la síntesis de ácidos grasos. La mitad restante necesaria se considera que se produce en la oxidación de los triosa fosfatos, en combinación con la citrato liasa ATP dependiente (EC 4.1.3.8) y el enzima málico, enzimas que produ-



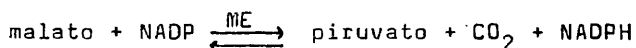
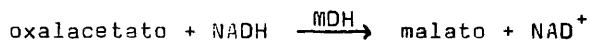
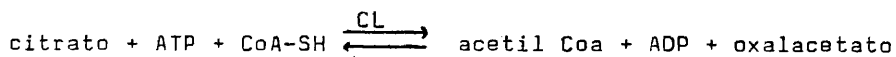
B-SIN CICLO DEL MALATO



A-CON CICLO DEL MALATO

CONVERSION DE GLUCOSA A ACIDOS GRASOS

con NADPH según las reacciones siguientes:



En este sistema de enzimas acoplados el NADH se intercambia con el NADPH. Los niveles de actividad citrato liasa y enzima málico suben o bajan concertadamente como consecuencia de la alimentación o ayuno (Olson, 1966; Bressler, 1970).

Krebs (1974) ha revisado el papel de los enzimas implicados en la producción de NADPH y lo relaciona con la lipogénesis y como este sistema está bajo control considera que exista un control "fino" a nivel de concentración de metabolitos y enzimas y un control "grueso" relacionado con la síntesis "de novo" de enzimas a nivel genético. Aunque los niveles del enzima málico disminuyen durante el ayuno y se incrementan con la alimentación, con lo cual su actividad se relaciona con la actividad lipogénica, el papel de la citrato liasa y las deshidrogenasas de las hexosa monofosfato está menos claro pues aunque su actividad incrementa por efecto de la insulina y con dieta rica en carbohidratos, éstos enzimas no disminuyen si las proteínas de la dieta se eliminan, aunque la lipogénesis se hace menor.

En ausencia de glucosa, la oxidación celular de los ácidos grasos de cadena larga proporciona la fuente principal de energía en el metabolismo intermediario. La cetosis es un fenómeno fisiológico que caracteriza el estado metabólico en el que los lípidos son el sustrato predominante generador de energía. En casos en los que la disponibilidad de carbohidratos esté total o parcialmente disminuída en relación a la fracción lipídica, se desarrollará la cetosis. Esto sucede en estados patológicos tales como la diabetes mellitus. Considerando que la velocidad de utilización de los carbohidratos respecto a los lípidos es el determinante crítico de la cetogénesis, aquellas hormonas que alteren las disponibilidades de estos sustratos juegan los papeles más importantes en su regulación (Bressler, 1970).

El grado de cetosis depende de un gran número de factores: a) velocidad de movilización de ácidos grasos a partir de las reservas del tejido adiposo; b) velocidad de incorporación y oxidación de los ácidos grasos por el hígado; c) velocidad de la utilización de carbohidratos en relación a a) y b); y d) velocidad de que los ácidos grasos y cuerpos cetónicos (acetoacetato y  $\beta$ OH butirato) sean utilizados por músculo y otros tejidos extrahepáticos.

De estos cuatro factores que gobiernan el grado de cetosis, la velocidad de oxidación de ácidos grasos por parte del hígado es aparentemente la más crítica de todos.



2.5.- El estado red-ox de los piridín nucleótidos en hígado de rata. Influencias reguladoras:

El estado red-ox de los nucleótidos de piridina en un compartimento celular determinado viene dado por el cálculo de los cocientes

$$\frac{\text{NAD libre}}{\text{NADH libre}} \quad \text{ó} \quad \frac{\text{NADP libre}}{\text{NADPH libre}}$$

en ese compartimento. Las medidas directas del contenido tisular en NAD(P) y NAD(P)H no proporcionan la información requerida, puesto que no establece diferencias entre los nucleótidos en estado libre y los que se encuentran ligados a proteínas - ni aportan información alguna sobre la distribución de estos - nucleótidos en los diversos compartimentos celulares. Esta última dificultad, no se puede resolver por los métodos usuales de fraccionamiento subcelular, puesto que el estado red-ox de los piridín nucleótidos es susceptible de sufrir cambios drásticos durante dicho proceso.

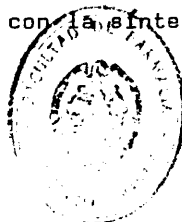
El procedimiento utilizado para conseguir calcular dicho estado redox ha sido mediante la determinación de la relación de concentraciones de los metabolitos oxidados y reducidos de sistemas deshidrogenásicos NAD(P)-dependientes adecuados (Holzer y cols., 1956; Bücher y Klingenberg, 1958). Estos metabolitos están localizados en diferentes compartimentos y debido a su elevada actividad, pueden alcanzar un estado de equilibrio o casi equilibrio con los nucleótidos de acuerdo con la rela-

ción:

$$\frac{\text{NAD}}{\text{NADH}} \quad \text{ó} \quad \frac{\text{NADP}}{\text{NADPH}} = 1/K_{eq} \quad \frac{\text{metabolito oxidado}}{\text{metabolito reducido}}$$

en la que si se conoce  $K_{eq}$  (constante de equilibrio de la reacción), se puede calcular la relación NAD/NADH ó NADP/NADPH, a partir de la relación de concentraciones metabolito oxidado/metabolito reducido.

El conocimiento del estado red-ox de los piridín nucleótidos en los diferentes compartimentos celulares, presenta un gran interés, pues suministra información sobre las características termodinámicas de los sistemas deshidrogenásicos implicados. En el caso del hígado, por ejemplo, es importante la reacción de la triosa fosfato deshidrogenasa, la cual según el estado glucolítico ó gluconeogénico del órgano, opera en direcciones opuestas, tratándose en ambos casos de la misma proteína. Esta relación determina también de qué manera los piridín nucleótidos puedan actuar como agentes reductores en las biosíntesis de ácidos grasos y glutamato y la magnitud de los cambios de energía libre en las reacciones de oxidoreducción que acompañan al transporte de electrones desde el NADH hasta las flavoproteínas en la cadena respiratoria. En este último caso, a menos que el cambio de energía libre supere un mínimo crítico, no se podrá efectuar un acoplamiento efectivo con la síntesis de ATP.



Estado red-ox del par NAD/NADH en el citosol y mitocondria de hígado de rata:

Existen al menos tres deshidrogenasas NAD-dependientes que bajo ciertas condiciones dan el mismo valor para el par NAD/NADH citosólico; lactato deshidrogenasa,  $\alpha$ -glicerofosfato deshidrogenasa y malato deshidrogenasa (Hohorst y cols. 1959). Este hecho representa una prueba convincente de que estos tres sistemas establecen equilibrio entre sus sustratos y los nucleótidos libres, en el compartimento celular - donde se hallan localizados el citoplasma (Krebs, 1967 y - 1969).

El cálculo del cociente NAD/NADH mitocondrial se lleva a cabo empleando dos enzimas:  $\beta$  hidroxibutirato y glutamato deshidrogenasa, como indicadoras respectivamente del estado red-ox de las crestas (Lehninger y cols., 1960) y de la matriz (Delbruk y cols., 1959). El equilibrio de la glutámico deshidrogenasa, presenta la desventaja de ser dependiente - de la concentración de amonio, debiéndose determinar los - tres sustratos  $\alpha$ -cetoglutarato, glutámico y amonio, para - obtener por este método el valor del cociente NAD/NADH mitocondrial.

Estado red-ox del par NADP/NADPH en el citosol y mitocondria de hígado de rata:

De las cinco deshidrogenasas citosólicas NADP-dependientes más abundantes glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, 6-fosfogluconato deshidrogenasa, glutathion reductasa, enzima málico descarboxilante e isocitrato deshidrogenasa, sólo las dos últimas pueden ser empleadas, por el momento, en los cálculos. La imposibilidad de emplear las otras tres nace de las dificultades analíticas encontradas en la determinación de los niveles de sus sustratos. (Estas dificultades son la pequeña concentración de los metabolitos que actúan como sustratos a la hora de medirlos espectrofotométricamente).

El cálculo del estado red-ox NADP/NADPH mitocondrial es sin duda el más controvertido. Emplea el sistema de la glutámico deshidrogenasa, cuya capacidad para actuar "in vitro" - tanto con NAD como con NADP, le confiere una capacidad transhidrogénásica "in vivo" no muy bien conocida (Krebs, 1967), que ha sido revisada más recientemente aunque sin conclusiones definitivas por BÜcher y Sies (1976). Existe sin embargo, un considerable cuerpo de evidencias que abogan por una actuación cuantitativamente superior de la glutámico deshidrogenasa NADPH-dependiente "in vivo" (Papa y cols., 1969), así como de su actuación indispensable acoplada a la ureogénesis (Sies y cols., 1976).



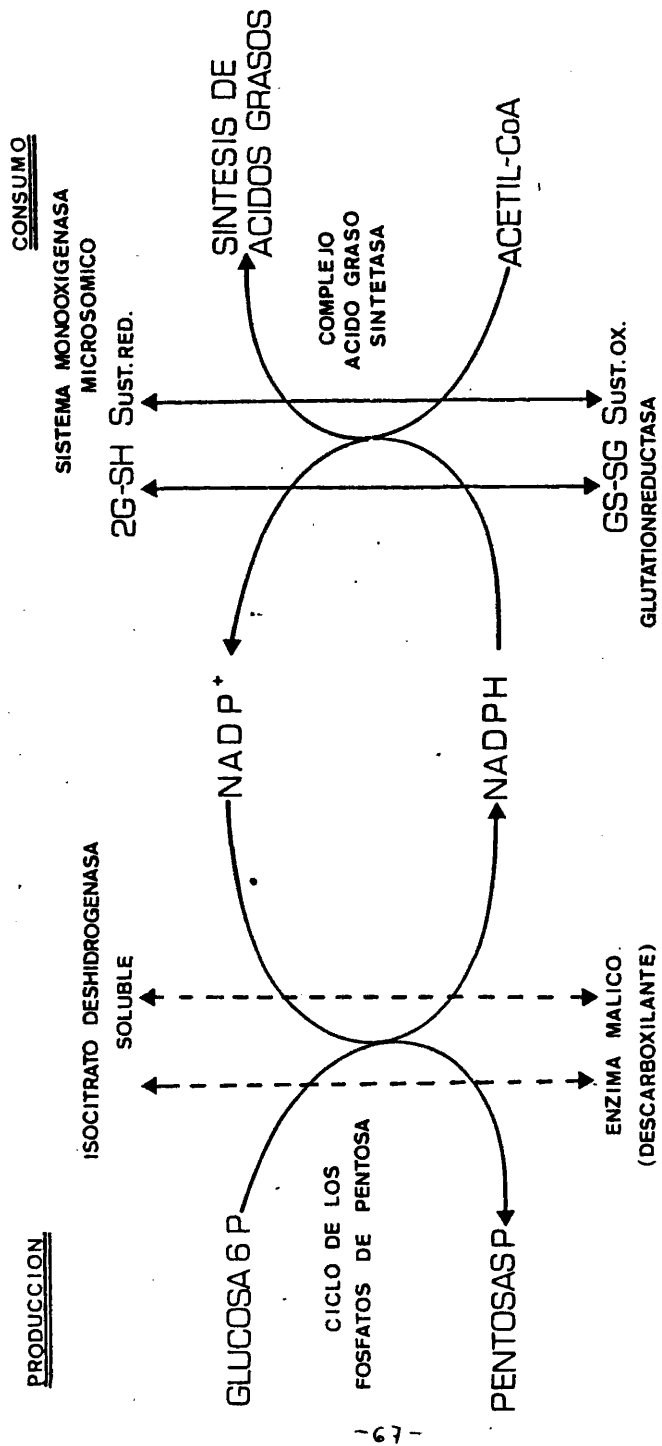


El valor del cociente  $\text{NAD(P)}/\text{NAD(P)H}$  en un determinado - compartimento, depende del equilibrio alcanzado entre las - contribuciones de los procesos que aportan  $\text{NAD(P)H}$  y las de los que los consumen. En la figura p.67 se muestran los principales sistemas que producen  $\text{NADPH}$  en el citosol de hígado de rata (segmento oxidativo del ciclo de los pentosas fosfatos, enzima málico e isocitrato, deshidrogenasa  $\text{NADP}$ -dependiente - citosólica), junto con los principales procesos consumidores de  $\text{NADPH}$ , como la síntesis de ácidos grasos y el sistema monooxygenada de acción mixta microsomal.

Thurman y Scholtz (1973) han puesto de manifiesto una - inhibición competitiva entre la biosíntesis de ácidos grasos y el funcionamiento del sistema monooxygenasa. Por otro lado, Scholtz y cols., (1973) han demostrado el papel competidor de la gluconeogénesis por el "pool"  $\text{NADP}/\text{NADPH}$ , debido a que com parten sustratos que utilizan  $\text{NADPH}$  como el malato (a través del enzima málico) o que lo producen, como la glucosa-6-fosfa to (sustrato del segmento oxidativo del ciclo de las pentosas fosfato), estableciendo el principal punto de inhibición competitiva de la gluconeogénesis a nivel del malato, por aparición de un "ciclo fútil" que descarboxilaría el malato a piru vato impidiendo la progresión de la vía biosintética.

Este mismo hecho podría explicar también la inhibición de la gluconeogénesis cuando la lipogénesis está acentuada.



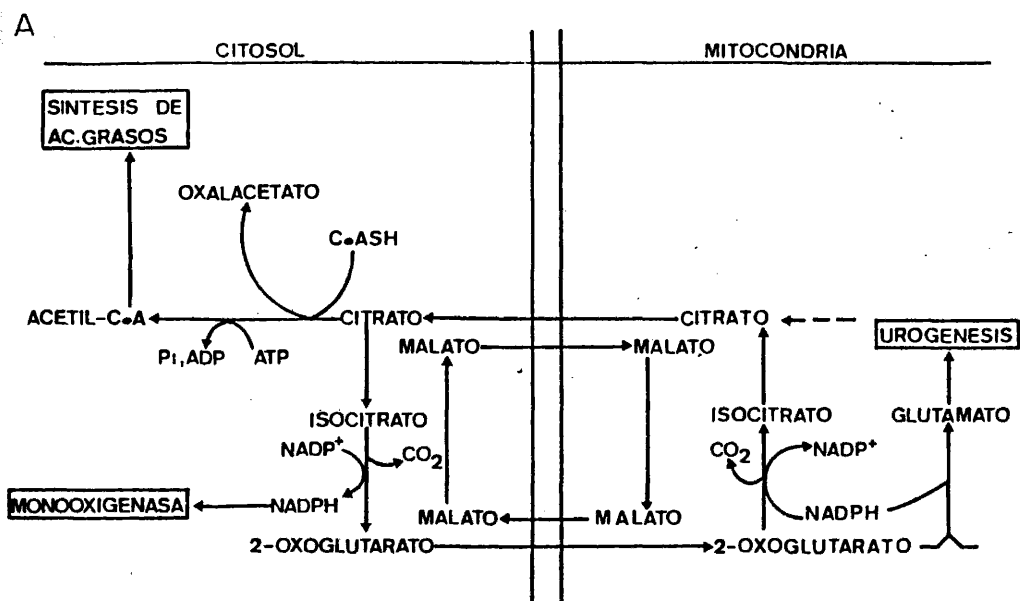


**EQUILIBRIO ENTRE LOS SISTEMAS PRODUCTORES Y CONSUMIDORES DE NADPH EN EL CITOSOL.**

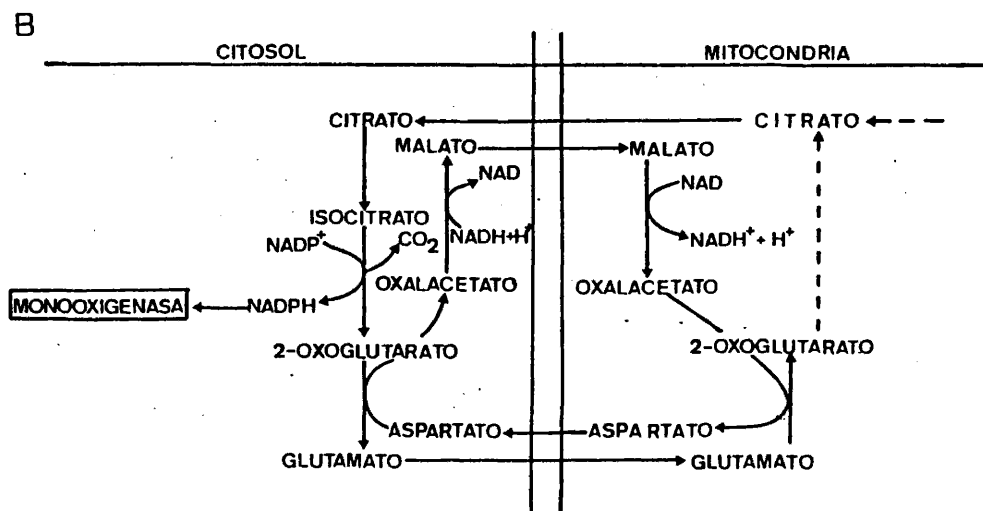
La relación NADP/NADPH mitocondrial depende a su vez, por un lado de los sistemas que generan NADPH, como la isocitrato deshidrogenasa NADP-dependiente (Sies y cols., 1976) y por otro, de los que lo consumen como la glutámico deshidrogenasa (Papa y cols., 1969) cuya función principal es la ureogénesis (Sies y cols. 1976).

La regulación existente entre el potencial reductor intra mitocondrial y extramitocondrial implica, debido a la impermeabilidad de la membrana interna mitocondrial a los nucleótidos (Lehninger, 1951), el funcionamiento de mecanismos de lanzadera que permitan el transporte de NADPH citosólico a la mitocondria cuando esta lo necesite (como en el caso de una elevada ureogénesis), y la exportación de potencial reductor mitocondrial en forma de NADPH cuando se produzcan procesos citosólicos que lo requieran (como la síntesis de ácidos grasos, gluconeogénesis, funcionamiento del sistema monooxigenasa microsómico, etc...).

En la figura p.69 parte A, aparece un esquema donde se refleja la transferencia de equivalentes reductores, en forma de NADPH, entre la mitocondria y el citosol, empleando el intercambio malato-2-oxoglutarato. En la figura p.69 parte B, se muestra el mismo esquema, pero detallando su relación con las aspartato aminotransferasas solubles y mitocondriales, empleando el intercambio citrato/malato y glutamato/aspartato, según Weigl y Sies (1977).



.- INTERCAMBIO DE EQUIVALENTES REDUCTORES (NADPH) ENTRE CITOSOL Y MITOCONDRIA.



.- INFLUENCIA DE LAS ASPARTATO AMINOTRANSFERASAS SOLUBLES Y MITOCONDRIALES EN EL TRANSPORTE DE EQUIVALENTES REDUCTORES (NADPH) ENTRE CITOSOL Y MITOCONDRIA.

(WEIGL Y SIES 1977)

Estos mecanismos presentan un gran interés cuando se investigan procesos que transcurren con acumulación de lípidos y alteraciones en la ureogénesis, como en el caso general de las hepatopatías y subsiguiente evolución hacia la cirrosis.

La regulación del cociente NAD/NADH mitocondrial ha sido estudiada desde el punto de vista bioenergético por Tager y cols. (1969). Conviene resaltar aquí su estrecha relación con el transporte de electrones a través de la cadena respiratoria (Krebs, 1969) y con la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos (Bremen y Wojtczac, 1972), lo que le confiere una singular importancia en el estudio de trastornos hepáticos que van generalmente acompañados con alteraciones en el metabolismo lipídico y respiratorio, como en el caso de las enfermedades hepáticas alcohólicas.

En la figura p. 69 se muestran algunos de los procesos de transporte de equivalentes reductores (NADH) entre el citosol y la mitocondria de hígado de rata. La lanzadera del  $\alpha$ -glicerofosfato es uno de los mecanismos celulares que llevan a cabo este transporte y cuya relevancia en hígado de rata ha sido discutida por Williamson<sup>y cols</sup> (1971), y estudiada detenidamente por Berry y cols. (1973) en hepatocitos aislados.

El "ciclo de Borst" o lanzadera del malato-aspartato es posiblemente el más importante cuantitativamente en hígado de rata, habiéndose estudiado su relación con la gluconeogénesis (Rongstad y Clark, 1974), ureogénesis (Meijer y cols., 1975), mediante el empleo de inhibidores como la cicloserina

o el aminooxiacetato que inhiben respectivamente las aminotransferasas solubles, o solubles y mitocondriales respectivamente (Söling, 1973). El empleo de aminooxiacetato como inhibidor ha sido revisado recientemente (Smith y cols. 1977). Davis y Lumeng (1976) han estudiado la influencia de la lanzadera del malato-aspartato sobre la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, encontrándose que si se estimula el flujo de equivalentes reductores a través de esta lanzadera, se provoca un aumento en la relación NADH/NAD mitocondrial que inhibe la  $\beta$ -oxidación y promueve un incremento en el transporte electrogénico del aspartato al citosol (La Noue y cols. 1974).

De todo lo anteriormente expuesto se deduce el elevado interés que puede presentar el estudio de estos mecanismos en las lesiones crónicas hepáticas producidas por ingestión de etanol, que pueden degenerar en cirrosis.



### 3.- M A T E R I A L   Y   M E T O D O S

### 3.1.- MATERIAL: Animales, Aparatos y Reactivos.

#### Animales:

Como animal de experimentación se han empleado ratas Wistar macho, cuyo peso fué de 180-220 gramos, y cuya edad era de unos tres meses. Como alimento se empleó pienso estandarizado comercial con la siguiente composición en principios inmediatos: carbohidratos 60%, grasa 3,5% y proteínas 19%. Además tiene un contenido en vitaminas del 1% y minerales 7,5%. Calculado el porcentaje calórico, resultó que el pienso originario contiene 68% de carbohidratos, 9% de grasa y 21% de proteínas. Como grasa se empleó grasa vegetal margarita cuyos componentes son: - aceite y grasas alimenticias y vitaminas.

#### Aparatos:

Centrífuga MSE-18 refrigerada. Espectrofotómetros UNICAM SP 1800 y SP 1750 termostatizados equipados con registro gráfico y cambiador automático de cubetas. Homogeneizador Tri-R Instruments con motor BRAUN-MELSUNGEN controlado por pedal, provisto de pistilo de teflón. pHmetro BECKMAN EXPANDOMATIC. Ultracentrífuga - BECKMAN L-5-50. ULTRA-TURRAX Janke & Kunkel KG T y P TP 18-10. Liofilizador LEYBOLD-HERAEUS GT2. Fotocolorímetro Spectronic 20 BAUSCH & LOMB. Bolsas de diálisis Scientific Instrument Center Ltd<sup>a</sup> (20 Å de poro). Cubetas de plástico SARSTEDT, 1 cm x 1 cm, nº 40/1010. Material quirúrgico: jeringas, pinzas rectas y curvas, bisturíes y tijeras de diversos tamaños. Micropipetas - OXFORD de 10, 20, 50, 100, 200 µl.



#### Reactivos:

Los ácidos y sales minerales que han sido utilizados son todos reactivo análisis, suministrados por la casa MERCK.

Los sustratos y coenzimas empleados en las determinaciones enzimáticas procedían todos de la casa SIGMA.

Los enzimas utilizados fueron suministrados por BOEHRINGER.

El acetaldehído empleado en el agua de bebida fué suministrado por la casa MERCK y el etanol por PROBUS.

#### 3.2.- Métodos.

##### 3.2.1.- Intoxicación.

Se realizaron varios tipos de intoxicaciones con el fin de lograr un estudio comparativo del efecto del etanol, etanol y grasa, grasa, etanol y acetaldehído y acetaldehído.

Para lograr una intoxicación etílica crónica se administró etanol en solución al 20% en el agua de bebida.

Otro grupo se intoxicó con etanol al 20% en el agua de bebida a la vez que una dieta rica en grasa, obtenida mezclando pienso estandarizado pulverizado y grasa vegetal margarina en una proporción: 60 partes pienso y 40 partes de grasa.

A un tercer lote se le administró una dieta rica en grasa. El cálculo de los porcentajes calóricos de los principios inmediatos en la mezcla pienso-grasa, resultó la siguiente: carbohidratos 38%, grasa 48% y proteínas 14%. Además de las vitaminas y minerales existentes en el pienso originario en un 1% - para las vitaminas y un 7,5% para los minerales, la grasa vege

tal contenía cantidades elevadas de vitaminas A (2.200 Us%) y D (350 Us%).

Al cuarto grupo se le administró una solución de etanol - al 20% y acetaldehído al 1,5-2% en el agua de bebida.

El quinto grupo se intoxicó mediante una solución al 1,5-2% de acetaldehído.

Por tanto, el experimento contó con 6 lotes según la alimentación y el tratamiento:

Lote (1) Alimentación normal (pienso estandarizado) y bebida agua.

Lote (2) Alimentación normal y bebida etanol al 20%.

Lote (3) Alimentación grasa y bebida etanol al 20%.

Lote (4) Alimentación grasa y bebida agua.

Lote (5) Alimentación normal y bebida etanol al 20% y acetaldehído al 1,5-2%.

Lote (6) Alimentación normal y bebida acetaldehído al 1,5-2%.

### 3.2.2.- Perfusión o lavado:

Se denomina perfusión al paso de flúidos o sangre a través de los conductos vasculares de un órgano, o bien, el mantenimiento de un órgano en estado viable, aislado del animal, por medio de la circulación de un medio artificial impulsado mecánicamente a través de su sistema vascular.

La perfusión en el trabajo que presentamos, es empleada únicamente para obtener órganos (en nuestro caso hígados) libres de sangre, y evitar de esta manera, las interferencias -

que ésta pudiera causarnos a la hora de determinar las actividades enzimáticas y concentración de metabolitos. Por todo ello, este proceso aquí desarrollado, puede acogerse a la denominación de "lavado" del hígado.

El procedimiento que se siguió en todas las experiencias fué el siguiente: Las ratas fueron anestesiadas intraperitonealmente, con una solución al 5% de NEMBUTAL (pentobarbital sódico) en solución fisiológica, hasta conseguir una dosis - de 50 mg./kg. de peso. Una vez alcanzado el grado de anestesia adecuada, se fijó el animal a la mesa de operaciones en posición de decúbito supino, y se procedió a la heparinización por vía femoral con 0,2 ml. de una solución de HEPARINA sódica ANALEMA 20.000 U.I./ml. Posteriormente se procedió a la apertura de la región abdominal, para disecar la vena porta y canularla, e inmediatamente cortar la vena cava previa rotura del esternón. A través de la vena porta canulada se llevó a cabo la perfusión o lavado, que consistió en hacer fluir unos 10 ml del líquido de perfusión por vía portal para arrastrar la sangre del hígado. Esta operación no debe durar más de 2 ó 3 minutos.

Como líquido de perfusión se empleó suero salino (Cl Na 0,9%), y conviene puntualizar aquí que la rapidez de la operación fué cuidadosamente vigilada, con objeto de evitar la destrucción de estructuras celulares, que provocarían la salida de enzimas al líquido de perfusión.

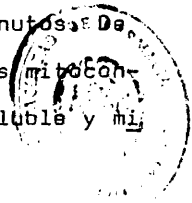


### 3.2.3.- Preparación de extractos para determinaciones enzimáticas:

Los extractos hepáticos se prepararon a partir de 2 g. de hígado perfundido, a los que se adicionaron 8 ml. de sacarosa 0,25 M (la solución se preparó sobre tampón Tris 0,02 M pH - 7,4, añadiendo 20 mg. de ditioeritritol por litro de solución). La relación de dilución del extracto obtenido respecto al hígado resultó ser 1/5.

La homogeneización subsiguiente se llevó a cabo en un homogeneizador BRAUN MELSUNGEN de pedal provisto de un pistilo de teflón, que ajusta en un recipiente de vidrio. El empleo del pistilo de teflón tiene por objeto el romper selectivamente la pared celular, dejando intactos el resto de los orgánulos celulares, como el núcleo, mitocondrias, ribosomas, etc., que se puede separar por centrifugación diferencial.

Para obtener la fracción mitocondrial, se centrifugó el homogenado, en una centrífuga MSE-18 Refrigerada, con cabeza angular 8 x 50 ml., a 1.800 g. (3.000 r.p.m.) durante 20 minutos, obteniéndose un precipitado (formado por glóbulos rojos, células hepáticas sin romper, restos celulares y núcleos) y un sobrenadante. El sobrenadante, una vez separado, se volvió a centrifugar a 10.000 g (12.000 r.p.m.) durante 20 minutos. De esta manera, se obtuvo un precipitado formado por las mitocondrias y un sobrenadante, que contiene la fracción soluble y microsomas.

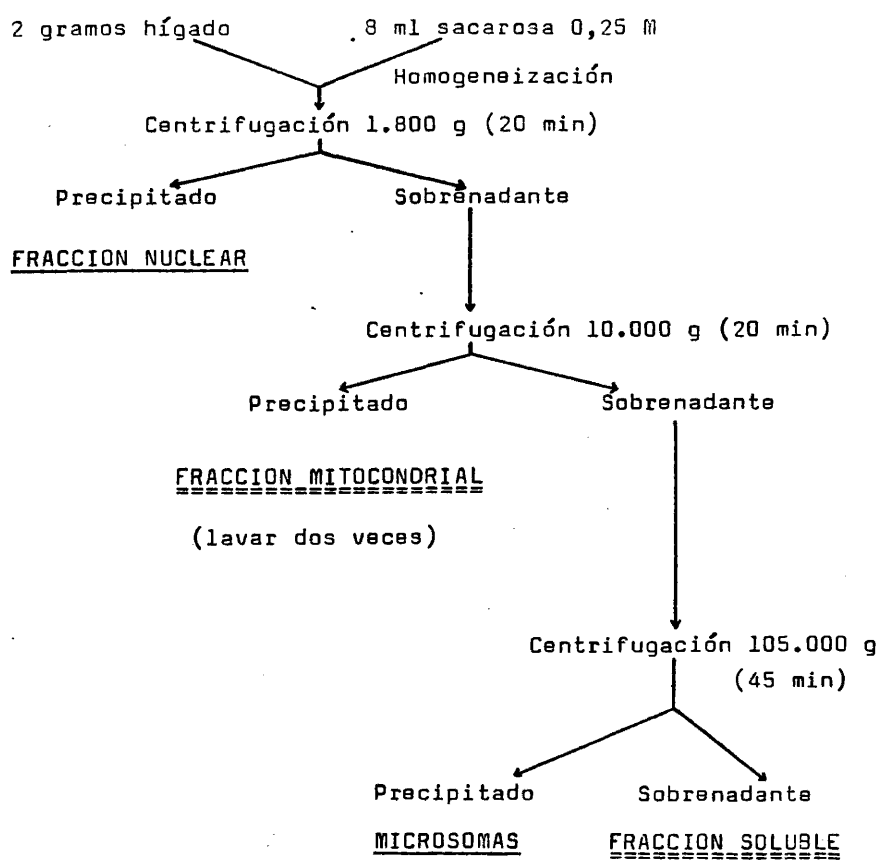


El precipitado, en el que se encuentra la fracción mitocondrial, se lavó dos veces para eliminar la contaminación con la fracción soluble. Para ello se añadieron 10 ml. de la solución antes citada de sacarosa 0,25 M, Tris 0,02 M pH 7,4 y DTT 20 mg./litro y se homogeneizó centrifugándose a 10.000 g (12.000 r.p.m.) durante 20 minutos, obteniéndose así un precipitado - donde se encuentra la fracción mitocondrial y el sobrenadante que contiene las impurezas. Esta operación se realizó nuevamente en el segundo lavado.

El precipitado mitocondrial así obtenido, se homogeneizó - añadiendo 2 ml. de la solución antes mencionada de sacarosa - 0,25 M, Tris 0,02 M pH 7,4, DTT 20 mg/litro; completando hasta 6 ml. con la solución de sacarosa. De esta manera se obtuvo - una suspensión mitocondrial 1:3 respecto al hígado.

El sobrenadante que contenía la fracción soluble y los microsomas, se centrifuga en una ultracentrífuga BECKMAN L5-50 - en rotor fijo a 40.000 r.p.m., correspondientes a 105.000 g. - durante 45 minutos. El sobrenadante transparente así obtenido, representa la fracción soluble citosólica, cuya dilución respecto al hígado de partida es 1/5.

La fracción soluble citosólica se dializó durante una hora a 4°C, con agitación, frente al medio antes citado de sacarosa. La diálisis se llevó a cabo con objeto de eliminar, en lo posible los metabolitos que pudieran interferir en las actividades enzimáticas que se van a determinar.



Esquema del fraccionamiento subcelular



#### 3.2.4.- Determinaciones enzimáticas: Generalidades:

Las determinaciones enzimáticas se llevaron a cabo en las fracciones solubles o mitocondrial del extracto hepático, preparado como se indica en la sección 3.2.3., en condiciones óptimas de pH y temperatura y a saturación de sustrato y co-factores. La reacción termostatzada a 37°C siguió en todos los casos una cinética de orden 0, al menos durante 5 minutos.

En las determinaciones se emplearon los espectrofotómetros UNICAM SP-1800 y SP 1750 equipados ambos con un sistema de termostatzación ajustado a 37°C, con cambiador automático de cubetas. Este accesorio permitió seguir la velocidad de 4 reacciones simultáneamente en cada aparato. Se utilizaron cubetas de plástico SARSTEDT, de 1,35 ml. de capacidad y 1 cm. de paso de luz.

Las actividades enzimáticas se determinaron directamente por reacciones acopladas a la oxidación-reducción del par NAD/NADH, siguiendo el cambio de densidad óptica a 340 nm, y empleando en los cálculos un coeficiente de extinción para el NADH =  $4,6 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (extinción de 1  $\mu\text{mol.}$  de NADH en 1,35 ml. de solución).

La actividad NADH oxidasa de los extractos de fracción fue medida inicialmente en cubeta sin sustrato, resultando despreciable con respecto a las actividades enzimáticas ensayadas.

### Cálculos:

Las velocidades iniciales de los diferentes enzimas se determinaron midiendo la pendiente de la recta recogida durante 5 minutos en el registrador automático. Dicha pendiente corresponde al cambio de densidad óptica debido a la aparición o desaparición de NAD(P)H, producido en la reacción directa o acoplada según los casos.

La actividad enzimática se determinó aplicando la fórmula siguiente:

$$\text{Actividad} = \frac{\text{dilución del extracto} \times \text{D.O.}}{\text{vol.} \times 4,6 \times 5} = F \times \text{D.O.}$$

Siendo: D.O. = Cambio de densidad óptica en 5 minutos.

vol. = volumen del extracto añadido a la cubeta en ml.

4,6 =  $\epsilon$  NADH corregido, para un volumen 1,35 ml.

5 = tiempo de registro en minutos.

El factor F engloba todos los valores constantes en una misma determinación. El resultado de multiplicar dicho factor por la densidad óptica de cada problema queda expresado en unidades de actividad enzimática, por gramo de tejido fresco.

Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima capaz de transformar un micromol de sustrato por minuto a 37°C, en las condiciones de experimenta-



ción.

3.2.4.1.- Hexocinasas y Glucocinasa. Cálculo de su perfil enzimático:

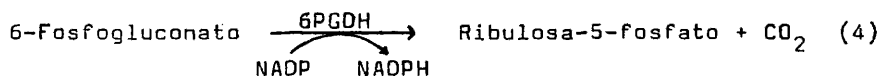
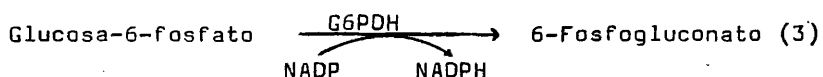
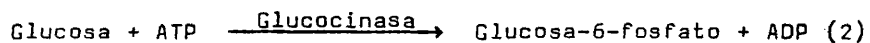
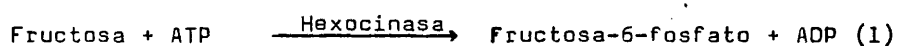
El procedimiento que se sigue es el de Gumaa y McLean (1972).

La reacción catalizada es:



Fundamento:

Consiste en acoplar la fosforilación (1) y (2), de la hexosa con dos reacciones NADP deshidrogenásicas (3) (4), cuyo empleo duplica la sensibilidad de la técnica.



La formación de NADPH se sigue espectrofotométricamente por el incremento de absorción a 340 nm. Como por cada molécula de hexosa transformada se transforman dos equivalentes

de NADPH, la densidad óptica obtenida ha de ser dividida por dos a la hora de realizar los cálculos.

La concentración que los diferentes reactivos alcanzaron en la cubeta resultó ser: Tris-ClH, pH 7,6, 40 mM; Cl<sub>2</sub>Mg 7,4 mM; ATP/Mg 7,4 mM; NADP 0,33 mM; G6PDH 7,4 µg y 6PGDH 7,4 µg. Como sustrato se emplearon glucosa 100 mM, glucosa 0,5 mM o fructosa 25 mM según la hexoquinasa a determinar.

Las diferentes hexocinasas se determinaron según el método descrito por Gumaa y McLean (1972). La extracción y preparación de fracciones solubles fueron idénticas a las empleadas en todas las determinaciones enzimáticas, excepto que una porción del dializado se calentó a 45°C durante 60 minutos - (Grossbard y Schimke, 1966; Katzen y Schimke, 1965). El calentamiento en ausencia de sustratos provoca desaparición casi completa del isoenzima II (Grossbard y Schimke, 1966) y del IV (Gumaa y McLean, 1972), y el 50% del isoenzima III (Grossbard y Schimke, 1966; McLean y cols., 1967). Por otro lado el isoenzima III tiene la especial propiedad de ser totalmente inhibido a una concentración de 100 mM de glucosa (Grossbard y Schimke, 1966).

Las ATP:D-glucosa 6-fosfotransferasas siguen una cinética normal de Michaelis-Menten y por tanto se puede esperar que cumplan la siguiente relación:

$$\frac{1}{v_x} = \frac{1}{V_x} \cdot \frac{K_m \times}{(S)} + 1$$



en donde  $v_x$  es la velocidad observada del isoenzima x,  $V_x$  es su velocidad máxima y  $K_m x$  es la correspondiente constante de Michaelis para el sustrato S y  $[S]$  es la concentración molar del sustrato.

A partir de la relación indicada, se puede calcular la velocidad máxima de cualquiera de los cuatro isoenzimas, conociendo las  $K_m$  para los respectivos sustratos y las concentraciones de sustratos en las mezclas de reacción (Tabla A). Si se opera de la manera descrita para los cuatro isoenzimas, se obtienen como velocidades teóricas (expresadas como fracción de la velocidad máxima) las que aparecen en la tabla 8.

TABLA A

Km para la glucosa y la fructosa

Isoenzima	Km Glucosa	Km Fructosa	V fructosa/V glucosa
I	$5 \cdot 10^{-5}$	$3,4 \cdot 10^{-3}$	1,15
II	$2,5 \cdot 10^{-4}$	$3,4 \cdot 10^{-3}$	1,15
III	$7 \cdot 10^{-6}$	$3,4 \cdot 10^{-3}$	1,15
IV	$1,0 \cdot 10^{-2}$	$2,0 \cdot 10^{-1}$	--

Todas las constantes pertenecen a trabajos publicados principalmente (Grossbard y Schimke, 1966).

TABLA B

Velocidades teóricas de las ATP: D-glucosa 6 fosfotransferasas

Isoenzima	Glucosa 0,5 mM	Glucosa 100 mM	Fructosa 25 mM
I	0,91	1,00	0,88
II	0,67	1,00	0,88
III	0,99	0,00	0,88
IV	0,05	0,83	0,01

Los valores dados representan las fracciones de la  $V_{\max}$  correspondiente al sustrato indicado y expresan velocidades teóricas  $v_x$ .

Las velocidades observadas de los isoenzimas I, II y III con fructosa 25 mM como sustrato son el 88% de las correspondientes velocidades máximas (Tabla B). Como la  $V_{\max}$  con fructosa es 1,15 veces mayor que  $V_{\max}$  con glucosa (Tabla A), se deduce por lo tanto que las velocidades observadas con fructosa se aproximan estrechamente a las  $V_{\max}$  teóricas de glucosa ya que

$$1.15 \times 0,88 = 1.01$$

Al aplicar el procedimiento descrito a extractos crudos de tejido hepático, como se muestran en la tabla C, se obtiene la siguiente distribución de isoenzimas:

A: Actividad total del extracto calentado con glucosa 0,5 mM como sustrato =  $0,91 V_1 + 0,5 V_3$ .

B: Actividad total del extracto calentado con glucosa 100

mM como sustrato =  $0,91 V_1$ .

C: Actividad total del extracto sin calentar con fructosa  
25 mM como sustrato =  $V_1 + V_2 + V_3$ .

D: Actividad total del extracto sin calentar con glucosa  
100 mM como sustrato =  $V_1 + V_2 + 0,83 V_4$ .

TABLA C

	I	II	III	IV	
Glucosa 0,5 mM calentado					A
Glucosa 100 mM calentado					E
Fructosa 25 mM sin calentar					C
Glucosa 100 mM sin calentar					D

Con objeto de calcular las actividades de los cuatro iso-enzimas en extractos crudos, hay que resolver el sistema anterior que lleva 4 ecuaciones con cuatro incógnitas. Las soluciones serán:



$$V_1 = 1,1 \text{ B}$$

$$V_3 = 2 (A - B)$$

$$V_2 = C - (V_1 + V_3)$$

$$V_4 = \frac{D - (V_1 + V_2)}{0,83}$$

Aplicando este procedimiento a los datos A, B, C y D obtenidos del extracto crudo se obtiene el perfil de los cuatro isoenzimas ATP: D-glucosa-6-fosfotransferasas.

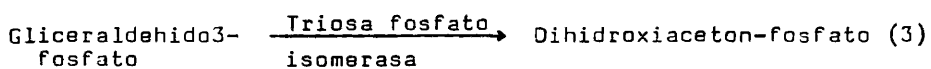
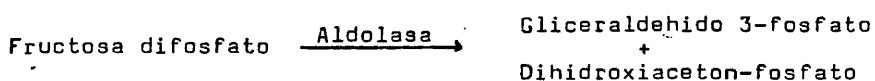
#### 3.2.4.2.- Fosfofructocinasa:

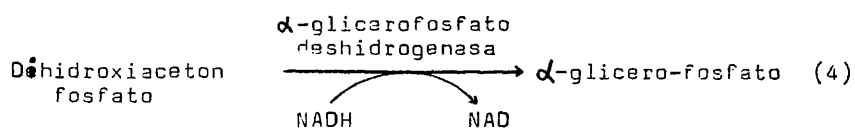
Su actividad se determinó esencialmente según Baquer y cols. (1976).

La reacción catalizada es:



#### Fundamento:





La reacción problema (1), se acopla sucesivamente con la (2) y (3), cuya misión es proporcionar el sustrato para la reacción indicadora (4). La oxidación de NADH en la reacción (4) se puede medir espectrofotométricamente por la disminución de densidad óptica a 340 nm. La reacción (1) es prácticamente irreversible, por lo que la reacción total está ampliamente desplazada hacia la derecha, de manera que la oxidación de NADH es un reflejo cuantitativo de la actividad fosfofructokinasa.

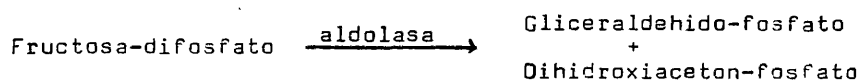
Como por cada mol de fructosa-6-fosfato transformada se originan dos equivalentes de NAD hay que dividir por 2 la diferencia en D.O. obtenida.

La concentración que los diferentes reactivos alcanzaron en la cubeta resultó ser: Tris-ClH pH 7,6; 50 mM; Mg Cl<sub>2</sub> 5 mM; ATP/Mg Cl<sub>2</sub> 0,29 mM; NADH 0,21 mM; F6P 1,85 mM; Aldolasa 7,4 µg; TIM/GDH 7,4 µg.

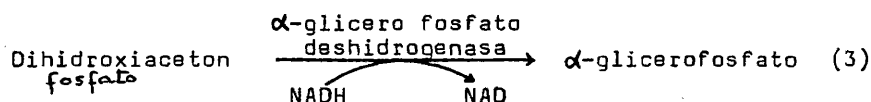
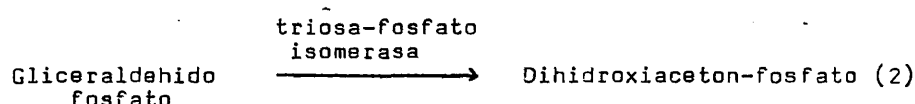
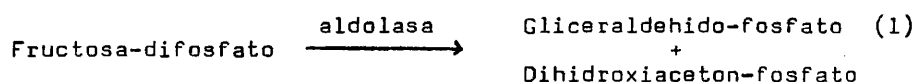
#### 3.2.4.3.- Aldolasa:

La actividad se determinó esencialmente según Bergmeyer, Gawehn y Grassl (1974).

La reacción catalizada es:



Fundamento:



La reacción se siguió espectrofotométricamente por la disminución en la densidad óptica a 340 nm durante 5 minutos a - 37°C.

El procedimiento consiste en acoplar la reacción problema (1), con una reacción indicadora (3) que oxida NADH, mediante una reacción puente (2). La reacción indicadora  $\alpha$ -glicero-fosfato-deshidrogenasa está ampliamente desplazada en el sentido de formación de  $\alpha$ -glicero fosfato, por tanto la oxidación del NADH es cuantitativa con respecto a la actividad aldolasa. Como por cada molécula de fructosa difosfato transformada se oxidan dos equivalentes de NADH la diferencia en densidad óptica obtenida tiene que dividirse por dos a la hora de verificar los cálculos.

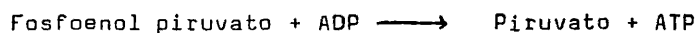


La concentración que los diferentes reactivos alcanzaron en la cubeta resultó ser: Tris-ClH, pH 7,4, 50 mM; <sup>Tampón</sup> NADH 0,207 mM; fructosa difosfato 1,85 mM; TIM/GDH 7,4 µg.

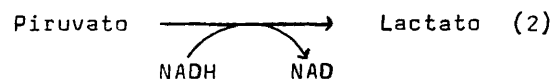
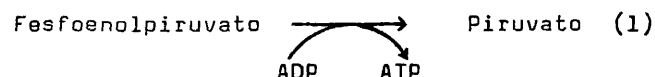
#### 3.2.4.4.- Piruvato cinasa.

Se determinó esencialmente según el método de Bergmeyer y cols (1974).

La reacción que cataliza es:



#### Fundamento:

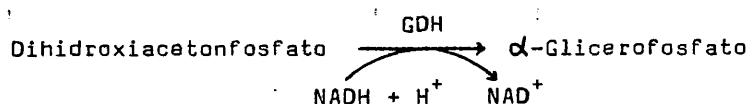


Consiste en acoplar la reacción problema (1) con una reacción indicadora (2). La reacción (1) es irreversible (enzima - clave de la glucólisis), mientras que la (2), aunque reversible su equilibrio está fuertemente desplazado hacia la formación de lactato. Por tanto, la velocidad de oxidación del NADH es prácticamente igual a la velocidad de la reacción (1). La reacción se sigue espectrofotométricamente midiendo la dismi-

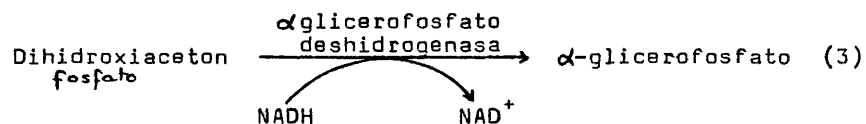
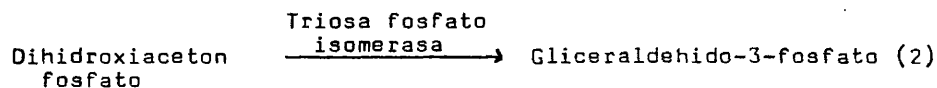
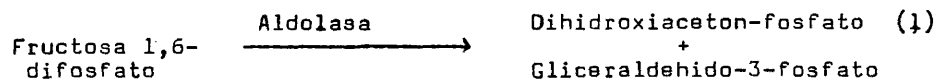
nución en la densidad óptica a 340 nm. La concentración que los diferentes reactivos alcanzaron en la cubeta resultó ser: tampón Tris ClH pH 7,6 50 mM; Mg Cl<sub>2</sub> 54 mM; NADH 0,21 mM; - ADP 0,9 mM; K Cl 70 mM; LDH 7,4 µg.

#### 3.2.4.5.- α-Glicerolfosfato deshidrogenasa soluble:

El enzima se determinó según la técnica de Bergmeyer y cols. (1974) por acoplamiento con un sistema aldolasa y triosafo-  
fato isomerasa (1 y 2) y fructosa difosfato como sustrato -  
inicial. La reacción catalizada es:



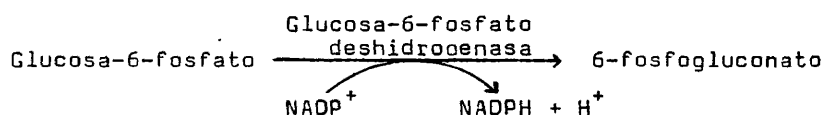
#### Fundamento:



Las reacciones (1) y (2) actúan como donadoras de sustrato para la reacción problema (3). En presencia de un exceso de NADH, todo el sistema está desplazado hacia la derecha por lo que la oxidación de NADH es un índice cuantitativo de la actividad glicerolfosfato deshidrogenasa. La reacción se sigue por la disminución de densidad óptica a 340 nm.

La concentración final de los reactivos en la cubeta resultó ser: tampón Tris, ClH pH 7,6 50 mM; FDP 1,85 mM; NADH 0,21 mM; TIM/GDH 7,4 µg.

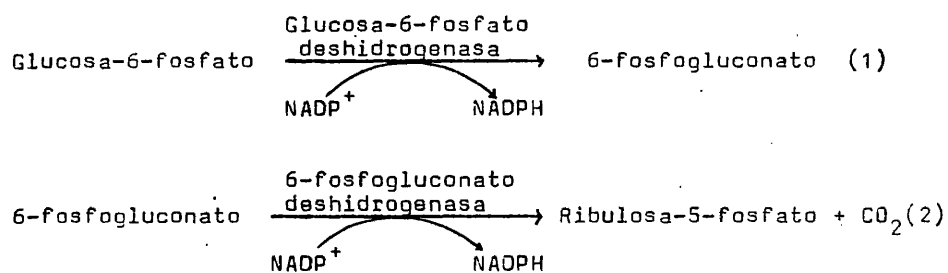
#### 3.2.4.6.- Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa:



#### Fundamento:

La actividad de este enzima se determinó empleando el método de doble sustrato propuesto por Glock y McLean (1953). - La velocidad de reacción en el que el 6-fosfogluconato formado a través de la reacción (1) (que incluye la actuación de una lactonasa endógena en el extracto), es descarboxilado a - ribulosa-5-fosfato por la actuación de la 6-fosfogluconato - deshidrogenasa exógena añadida en la mezcla de reacción. El - resultado es la producción de 2 moles de NADPH por mol de glu

cosa-6-fosfato transformado en la reacción (1). La introducción de 6-fosfogluconato deshidrogenasa duplica la sensibilidad de la reacción, por lo cual hay que dividir por dos a la hora de hacer los cálculos.



La concentración final de los diferentes reactivos en la cubeta resultó ser:

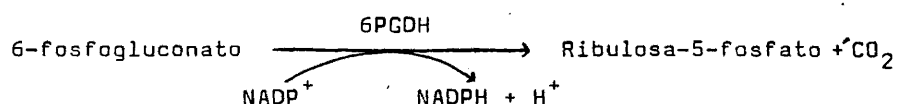
Tampón glicil glicocola/Mg pH 7,4 0,1 M; NADP 0,2 mM; glucosa 6-fosfato 1,85 mM y 6-fosfogluconato deshidrogenasa 7,4 µg.

#### 3.2.4.7.- 6-fosfogluconato deshidrogenasa.

Su actividad se determinó espectrofotométricamente a 340 nm de acuerdo con la técnica de King (1974).

Fundamento:

Consiste en medir directamente el incremento en densidad óptica a 340 nm. provocado por la aparición de NADPH, en la reacción:



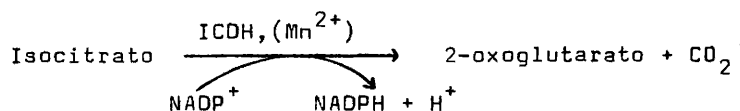
La concentración final de los diferentes reactivos en la cubeta resultó ser:

Tampón Glicilglicocola/Mg pH 7,6 92,6 mM; NADP 0,2 mM; 6-fosfogluconato 1,85 mM.

3.2.4.8.- Isocitrato deshidrogenasa (NADP) soluble:

La actividad se determina espectrofotométricamente según Baquer y cols. (1976).

Fundamento:



La reacción se sigue espectrofotométricamente midiendo la aparición de NADPH a 340 nm. El sistema está ampliamente desplazado hacia la derecha. La concentración final de los diferentes reactivos en la cubeta resultó ser:

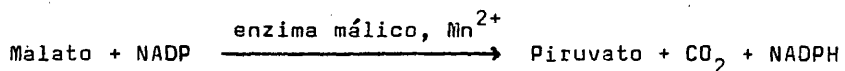
Tampón Tris ClH pH 7,6 50 mM; Mn Cl<sub>2</sub> 1,85 mM; Isocitrato 1,85 mM; NADP 0,192 mM.

#### 3.2.4.9.- Enzima málico:

La actividad se determina espectrofotométricamente según Baquer y cols. (1976).

##### Fundamento:

Consiste en medir directamente el incremento en la densidad óptica a 340 nm. producido por la aparición de NADPH en la reacción siguiente:



La concentración que los diferentes reactivos alcanzaron en la cubeta fué la siguiente:

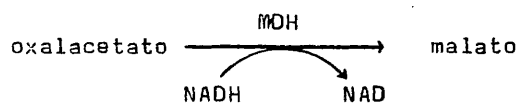
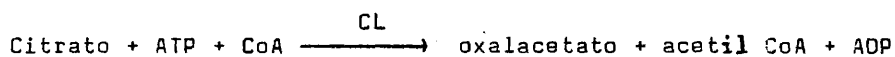
Tampón Tris 50 mM; MnCl<sub>2</sub> 1,85 mM; Malato 1,85 mM; NADP 0,192 mM.

#### 3,2.4.10.- ATP-citrato liasa.

La actividad se determina espectrofotométricamente según Bergmeyer y cols. (1974) modificado.

#### Fundamento:

Consiste en medir la disminución en la densidad óptica a 340 nm, producida por la desaparición del NADH en la reacción acoplada con la malato deshidrogenasa.



La concentración final en la cubeta de los distintos reactivos resultó ser:

Tampón Tris ClH pH 7,6 50 mM; ATP/MgCl<sub>2</sub> 7,4 mM; citrato 1,85 mM; NADH 0,21 mM; DTT 1,48 mM; CoA 0,26 mM; MDH 7,4 µg.

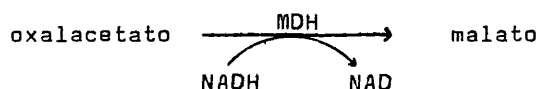
Como la reacción (2) está fuertemente inclinada a la formación de malato la desaparición de NADH coincide cuantitativamente con la formación de oxalacetato catalizado por la citrato liasa.

#### 3.2.4.11.- Malato deshidrogenasa:

La actividad se determina espectrofotométricamente según Bergmeyer y cols. (1974).

Fundamento:

Consiste en medir directamente la disminución en la densidad óptica a 340 nm, producida por la desaparición de NADH en la reacción siguiente:



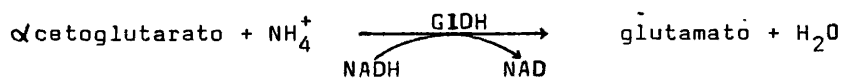
La concentración final de los diferentes reactivos en la cubeta resultó ser:  
glicilglicocola/ $\text{Cl}_2\text{Mg}$  pH 7,6 92,6 mM; NADH 0,21 mM; oxalacetato 0,28 mM.

3.2.4.12.- Glutamato deshidrogenasa.

La actividad se determina espectrofotométricamente según Bergmeyer y cols.(1974).

Fundamento:

Consiste en medir directamente el incremento en la densidad óptica a 340 nm producida por la formación de NADH en la reacción siguiente:



La concentración final de los diferentes reactivos en la cubeta resultó ser: Tampón fosfato pH 7,4 74 mM; NADH 0,21 mM;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  74 mM; 2-oxoglutarato 15 mM; ADP 0,9 mM.



3.2.5.- Preparación de extractos para la determinación de metabolitos:

Se empleó el método de extracción en medio ácido según el procedimiento descrito por Lagunas y cols. (1970).

Los animales se sacrificaron por dislocación cervical. - Inmediatamente se extrajo una porción de hígado que fué rápidamente prensada y congelada, mediante la ayuda de una pinza cuyos brazos terminan en dos planchas de acero que se mantuvieron previamente sumergidas en nitrógeno líquido. A partir del trozo de hígado así obtenido, se pesaron 2 gramos, los - cuales una vez troceados se suspendieron en 9 volúmenes (18 ml.) de ácido perclórico 0,5 M en etanol al 20%, y se homogeneizaron en un Ultraturrax durante 2 minutos.

Es muy importante que las muestras de tejido sean congeladas tan rápidamente como sea posible puesto que los niveles de muchos metabolitos como el ATP, ornitina, lactato, - etc., resultan muy afectados por el estado anóxico producido en la muerte del animal (Lowry y cols., 1964; Williamson, 1966). La congelación del tejido entre las dos placas metálicas, previamente sumergidas en nitrógeno líquido "Freeze-clamp" (Wollemberger y cols., 1960), permite una congelación más rápida por aumentar la superficie del tejido. El periodo de - tiempo transcurrido entre la muerte del animal y la congelación del hígado no debe ser superior a los 10 segundos (Veech

y cols., 1969).

El homogenado ácido así obtenido se centrifugó en frío a 3.000 g durante 10 minutos. Se decantó el sobrenadante y se extrajo el precipitado con 2 volúmenes del mismo medio de extracción. Los sobrenadantes ácidos mezclados y tamponados (Tris 0,1 M pH 7,4) se llevaron a pH 6,8 - 7,0, por adición lenta de KOH, con agitación continua. El precipitado de  $KClO_4$ , que se forma al neutralizar, se separó por centrifugación y el sobrenadante se colocó en un matraz Erlenmeyer de 100 ml de capacidad cuya boca se cubrió con un trozo de gasa sujeto mediante un aro de goma alrededor del cuello del frasco. Estos extractos se liofilizaron posteriormente hasta sequedad en un aparato Leybold-Heraeus GT2, del gabinete de Técnicas Instrumentales de la Facultad de Farmacia de Madrid. Una vez liofilizadas las muestras, se mantuvieron a  $-13^{\circ}C$  hasta el momento de ser utilizadas, pudiendo conservarse indefinidamente en estas condiciones.

Para la determinación de metabolitos se diluyó el liofilizado hasta 4 ml con agua destilada (dilución 1:2) y el extracto obtenido se centrifugó a 3.000 g con el objeto de eliminar el precipitado de sal potásica ( $KClO_4$ ).

Las determinaciones de la concentración de metabolitos se llevaron a cabo según las técnicas que a continuación se describen para cada uno de ellos, iniciándose las valoraciones por aquellos más inestables como los  $\alpha$ -cetoácidos, ATP, etc.

Las valoraciones se realizaron espectrofotométricamente acoplándolas a reacciones de óxido-reducción del NAD(P)H ó NAD(P), siguiendo los cambios en la densidad óptica a 340 nm. En todos los casos se comprobó que el  $KClO_4$  residual, presente en los extractos, no afectaba la actividad de los enzimas añadidos. Los espectrofotómetros empleados fueron: UNICAM modelo SP-1800 y modelo SP-1750 termostatzado a 37°C y equipados ambos con un accesorio cambiador de cubetas automático modelo SP-1805. Este accesorio permitió llevar a cabo cuatro determinaciones simultáneas en cubetas diferentes en cada espectrofotómetro.

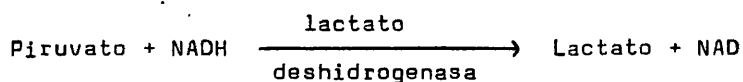
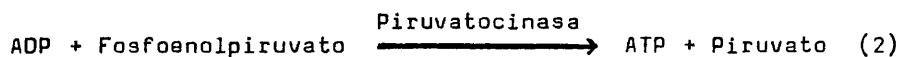
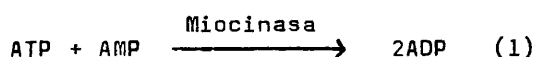
Las lecturas se registraron en una carta espectrofotométrica, según se muestra en la figura de la página 102. Los cálculos de las determinaciones fueron prácticamente idénticos en todos los casos, variando únicamente los volúmenes de extracto añadidos según la concentración en el extracto del metabolito a determinar. A continuación presentamos un ejemplo práctico.



3.2.5.1.- Determinación de dos o más metabolitos en la misma cubeta mediante sistemas enzimáticos acoplados.

Determinación de ADP y AMP:

En este caso la técnica de Adam (1965) permite la determinación de dos metabolitos en la misma cubeta, mediante sistemas enzimáticos acoplados:



La mezcla de reactivos en la cubeta contiene además del tampón a pH apropiado, ATP, fosfoenolpiruvato y NADH.

Se inicia la reacción adicionando a la mezcla de reactivos una alícuota de extracto (50  $\mu$ litros de extracto diluído 1:2), con ello se consigue una línea base de D.O.  $A_0$ , que debe ser recta en ausencia de actividad NADH oxidásicas, que pudieran contaminar. Acto seguido se añade el primer enzima, en este caso lactato deshidrogenasa, y se originará un cambio de absorbancia correspondiente al piruvato existente en el extracto. Una vez consumido todo el piruvato se obtendrá una línea paralela a la línea base de D.O.  $A_1$  constante, La adición

del segundo enzima, la piruvato cinasa, originará un nuevo descenso en la absorbancia, debido al ADP presente en el extracto, y se seguirá la reacción hasta que nuevamente la D.O. sea constante ( $A_2$ ). Por último, la adición de miocinasa producirá un nuevo descenso en la absorbancia que se seguirá hasta que la D.O. sea constante ( $A_3$ ).

Este último cambio de D.O. entre la adición de piruvato cinasa y miocinasa corresponderá al doble de la concentración de AMP existente en el extracto. Al final de la reacción se adicionaron por separado cada uno de los enzimas para observar las posibles variaciones en D.O. provocadas por la proteína enzimática. Estos cambios se restan o suman de las variaciones correspondientes obtenidas en cada uno de los diferentes metabolitos.

El cálculo de la concentración de ADP y AMP fué el siguiente:

$$\text{concentración ADP} = \frac{\text{D.O.} \times \text{dilución}}{\text{Volúmen} \times 4.6}$$

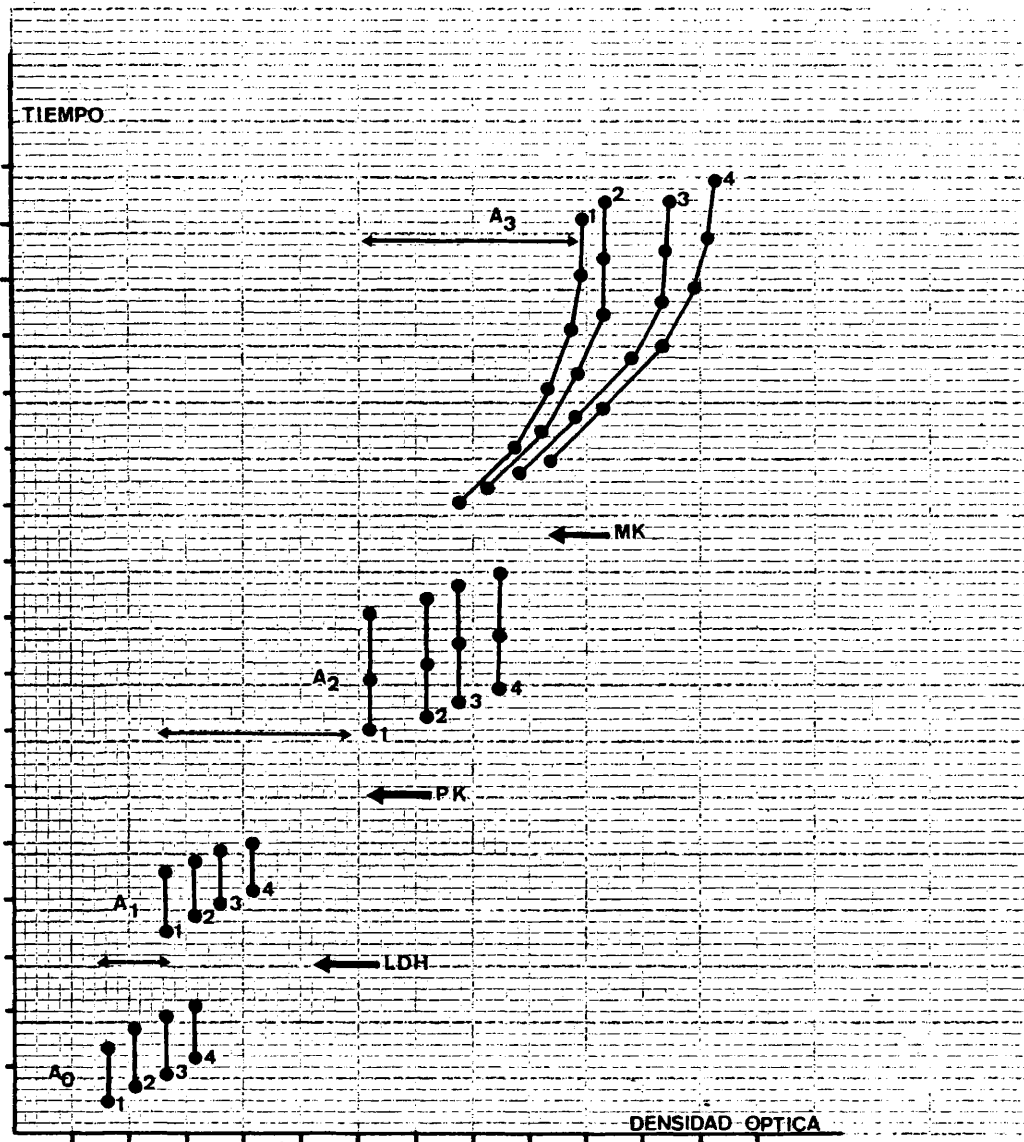
$$\text{D.O.} = A_2 - A_1$$

Volúmen extracto = 0,05 ml.

Dilución extracto = 2

Coefficiente de extinción NAD para volúmen 1,35 = 4,6

$$\text{Concentración en nanomoles/g hígado} = \frac{(A_2 - A_1) \times 2}{0,05 \times 4,6}$$



DETERMINACION ESPECTROFOTOMETRICA DE ADP Y AMP

(EXPLICACION EN EL TEXTO)

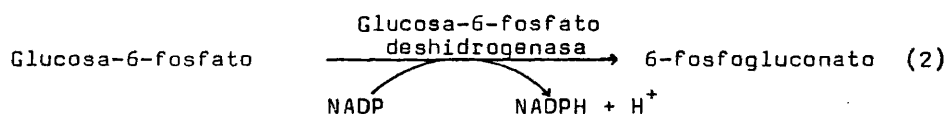
AMP :

En el caso del AMP los cálculos fueron similares. Como por cada molécula de AMP presente en el extracto se oxidan 2 moléculas de NADH hay que dividir por 2 el resultado obtenido aplicando la D.O.  $A_3 - A_2$ .

$$\text{Concentración AMP} = \frac{(A_3 - A_2) \times 2}{0,05 \times 4,6 \times 2}$$

### 3.2.5.2.- Glucosa y Glucosa-6-fosfato:

El método seguido es una modificación del de Slein - (1965), propuesto por Lagunas y McLean (1970).



La hexocinasa cataliza la fosforilación de glucosa por el ATP (1). La glucosa-6-fosfato así formada se oxida, en presencia de  $\text{NADP}^+$ , por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (2). - Ambas reacciones proceden cuantitativamente y estequiométricamente. El NADPH formado en la reacción (2) se determina espectrofotométricamente por lectura de absorbancia a 340 nm.

La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa se adiciona a la cuba

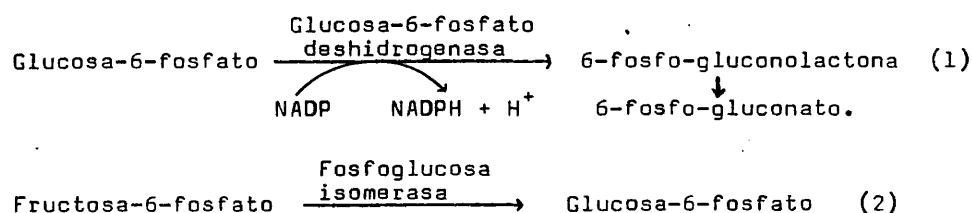
ta en primer lugar y el NADPH formado corresponde a la glucosa-6-fosfato existente en el extracto. Después se adiciona la hexocinasa y el NADPH formado corresponderá a la glucosa existente en el extracto. Como las concentraciones de glucosa y - glucosa-6-fosfato difieren mucho, este método se emplea sólo para la determinación de glucosa.

Las concentraciones finales en la cubeta de los diferentes reactivo fué: Tampón glicil-glicocola pH 7,6 46 mM; NADP 0,2 mM; ATP/Mg 7,4 mM; G6PDH 7,6 ug; HK 7,6 µg.

### 3.2.5.3.- Glucosa-6-fosfato y fructosa-6-fosfato:

El método empleado fué el de Lang, Michal (1974).

#### Fundamento:



La reacción (1) está ampliamente desplazada hacia la derecha, la oxidación de glucosa-6-fosfato procede de manera - cuantitativa. La reacción se mide por el aumento de densidad óptica a 340 nm debido a la reducción del NADP. Acoplando la reacción (2) con la reacción (1), la fructosa-6-fosfato puede



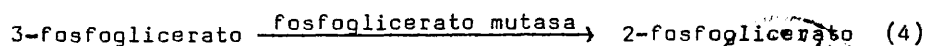
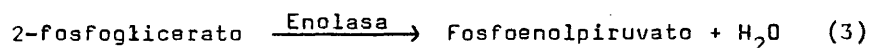
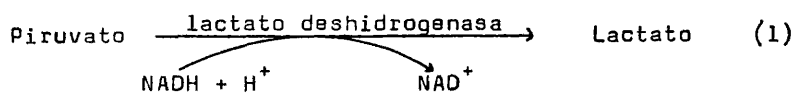
hacerse reaccionar cuantitativamente en presencia de un exceso de NADP.

La concentración final de los diferentes reactivos en la cubeta resultó ser: Tampón glicil-glicocola/Mg pH 7,6 0,1 M; NADP 0,2 mM; Ditioneritritol 0,4 mM; G6PDH 7,6 µg; PGI 7,6 µg; PGM 7,6 µg y aldolasa 7,6 µg.

3.2.5.4.- Piruvato, fosfoenolpiruvato, 2-fosfoglicerato y 3-fosfoglicerato:

Se sigue un método descrito por Lagunas y McLean (1970), que es una modificación por acoplamiento de la reacción (4) sobre el sistema propuesto por Czok y Eckert (1965).

Fundamento:



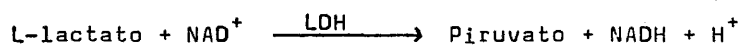
Mediante el acoplamiento de las reacciones (2), (3) y (4) sobre la (1) se pueden determinar, por las caídas de densidades ópticas a 340 nm, las concentraciones de los diversos metabolitos en los extractos problemas. La reacción (1) está - ampliamente desplazada hacia la derecha, y procede cuantitativamente con reducción de NADH, cada vez que se forma nuevo piruvato por acoplamiento (2), (3) y (4).

La concentración final en la cubeta de los diferentes reactivos resultó ser: Tampón trietanolamina 0,1 M pH 7,6; - NADH 0,21 mM; Ditiocetritol 0,2 mM; ADP 1 mM; K Cl 28 mM; - Mg Cl<sub>2</sub> 5 mM; LDH 7,6 µg; PK 7,6 µg; ENOL 7,6 µg; PGM 7,6 µg.

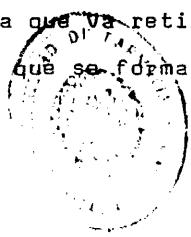
#### 3.2.5.5.- Lactato:

El método es una modificación del propuesto por Hohorst (1959) y (1963) y modificado por Lagunas y McLean (1970).

#### Fundamento:

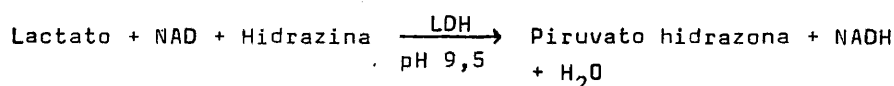


El equilibrio de la reacción está muy desplazado hacia la izquierda. La técnica desplaza el equilibrio en sentido contrario empleando un medio alcalino para atrapar los protones y, - un exceso de concentración de NAD<sup>+</sup> e hidrazina que va retirando el piruvato en forma de hidrazona a medida que se forma. El



resultado es una reducción cuantitativa del  $\text{NAD}^+$  que se puede seguir espectrofotométricamente por el incremento de absorción a 340 nm.

La reacción básica de la determinación espectrofotométrica es:

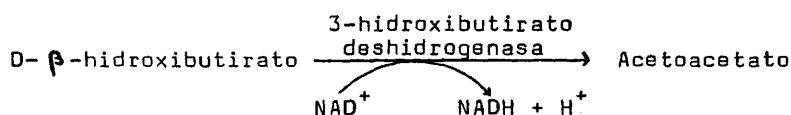


La concentración final de los diferentes reactivos en la cubeta resultó ser: Tampón Tris-ClH pH 9,1 37 mM; Hidrazina 0,15 M;  $\text{Mg SO}_4$  3,7 mM; EDTA 1,85 mM; NAD 1,12 mM; LDH 7,6  $\mu\text{g}$ .

### 3.2.5.6.- $\beta$ -Hidroxibutirato:

El método empleado es el de Williamson y Mellanby (1974).

Fundamento:



La constante de equilibrio de la reacción es  $1,45 \cdot 10^{-9}$  (Williamson y cols. 1962) a 25°C. Así, a pH 9,1 casi el 50% del hidroxibutirato es oxidado a acetoacetato. La reacción se desplaza hacia la derecha en presencia de elevadas concentraciones de  $\text{NAD}^+$ . La presencia de hidrazina va eliminando el acetoacetato a medida que se forma y de esta manera la

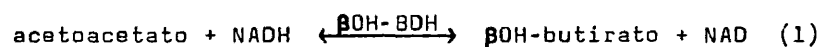
reacción se desplaza aún más hacia la derecha. El incremento de densidad óptica a 340 nm debido a la formación de NADH se puede emplear por tanto como medida cuantitativa de la reacción, de la concentración de  $\beta$ -hidroxibutirato.

La concentración de los diferentes reactivos en la cubeta resultó ser: Tampón Tris-ClH pH 9,1 37 mM; Hidrazina 0,15 M;  $MgSO_4$  3,7 mM; EDTA 1,85 mM; NAD 1,12 mM;  $\beta$ OH-BDH 7,6  $\mu$ g.

### 3.2.5.7.- Acetoacetato y $\alpha$ -cetoglutarato.

Los métodos empleados fueron el de Mellanby y Williamson (1974) y el de Bergmeyer y Bernt (1974).

#### Fundamento:

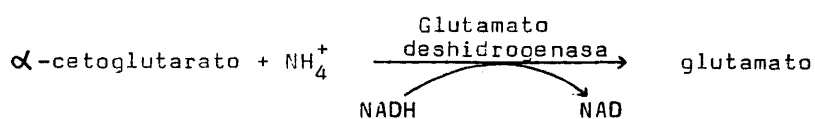


La constante de equilibrio de esta reacción es  $K = 1,45 \times 10^{-9}$  a 25°C (Williamson y cols., 1962). A pH 7,0 y con un apropiado exceso de NADH, un 98% del acetoacetato se reduce a hidroxibutirato, con oxidación simultánea de una cantidad equivalente de NADH.

La concentración en la cubeta de los diferentes reactivos fué la siguiente: tampón trietanolamina/magnesio pH 7,6, 0,2 M; NADH 0,21 mM y  $\beta$ -hidroxibutirato deshidrogenasa 20  $\mu$ g.

En la misma cubeta se determinó el  $\alpha$ -cetoglutarato según

la siguiente reacción:



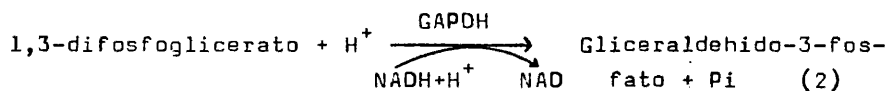
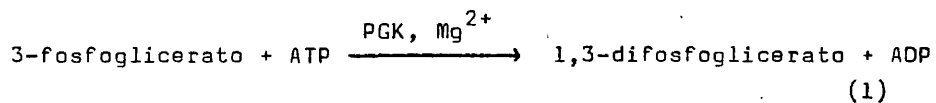
Para ello se adicionó a la cubeta  $\text{Cl NH}_4$  7,4 mM; ADP 1 mM (activador de la glutamato deshidrogenasa) se estableció una línea base y se añadió el enzima correspondiente la glutamato deshidrogenasa 20  $\mu\text{g}$ .

La oxidación del NADH determinada a 340 nm es un índice cuantitativo en ambas determinaciones.

#### 3.2.5.8.- 1,3-difosfoglicerato y ATP:

El método utilizado es una modificación del de Adam (1965), por Lagunas y McLean (1970).

##### Fundamento:



El 1,3-difosfoglicerato formado en la reacción (1) es reducido por la gliceraldehido 3-fosfatodeshidrogenasa y NADH. La reacción (1) es 8,8 veces más lenta de izquierda a derecha que de derecha a izquierda (Sücher, 1947). El equilibrio de -

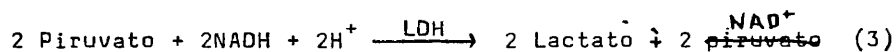
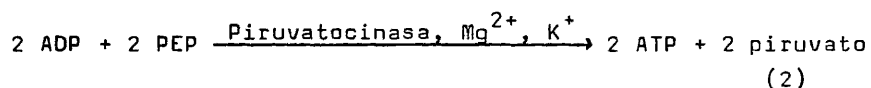
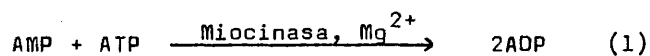
la reacción (2) está desplazado en un 65% hacia la derecha, de manera que 1,3 difosfoglicerato formado en la reacción (1) se transforma rápidamente por la reacción (2), que se puede seguir por el descenso de absorbancia a 340 nm.

Las concentraciones finales de los diferentes reactivos en la cubeta fueron: Tampón trietanolamina pH 7,6, 0,15 M;  $\text{SO}_4\text{Mg}$  6 mM; 3-fosfoglicerato 8,8 mM; NADH 0,21 mM; ditioeritritol 0,2 mM; gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa 20  $\mu\text{g}$  y fosfogliceratocinasa 7,6  $\mu\text{g}$ .

### 3.2.5.9.- ADP y AMP

El procedimiento seguido es esencialmente el de Adam (1965) modificado por Lagunas y McLean (1970).

#### Fundamento:



La reacción (3), que se emplea como reacción indicadora, está ampliamente desplazada a la derecha (Kubowitz y Ott, 1943) y es capaz de reducir todo el piruvato formado en la

reacción (2). La reacción (2), está también desplazada hacia la derecha y permite alcanzar un equilibrio con la reacción (1) de manera que todo el AMP puede reaccionar, y la disminución de la densidad óptica a 340 nm - debida a la oxidación del NADH - es un índice cuantitativo del ADP y AMP presentes en el extracto.

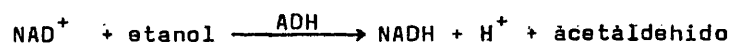
Las concentraciones finales en la cubeta, de los diferentes reactivos fueron: tampón trietanolamina pH 7,4, 0,2 M; NADH 0,21 mM; ditioeritritol, 0,2 mM; fosfoenolpiruvato 1,1 mM; CLK 0,1 M; sulfato magnésico 30 mM; lactato deshidrogenasa 7,8 µg; piruvato cinasa 7,8 µg y miocinasa 7,8 µg.

#### 3.2.5.10.- NAD

La determinación se realizó esencialmente según el método de Klingenberg (1974).

##### Fundamento

Se empleó un sistema de alcohol deshidrogenasa, en el que la reacción procede estrictamente según el contenido en  $\text{NAD}^+$  del extracto problema.



La reacción está desplazada hacia la izquierda, pero en condiciones alcalinas (sustracción de protones) y eliminando



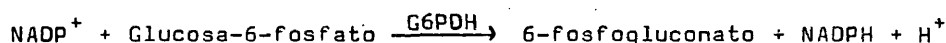
el acetaldehído del medio por reacción con hidrazina para formar la hidrazona, en presencia de elevadas concentraciones de  $\text{NAD}^+$  la reacción se desplaza cuantitativamente hacia la derecha. La medida de la densidad óptica a 340 nm en estas condiciones es directamente proporcional a la concentración de  $\text{NAD}^+$  presente en el extracto.

Las concentraciones de los diferentes reactivos en la cubeta resultaron ser: tampón tris-ClH pH 8,5, 37 mM; etanol 0,16 mM; hidrazina 0,15 M;  $\text{SO}_4\text{Mg}$  3,7 mM; EDTA 1,85 mM y alcohol deshidrogenasa 4  $\mu\text{g}$ .

#### 3.2.5.11 - NADP:

La determinación se llevó a cabo según el método de Klingenberg (1974).

#### Fundamento:



La determinación se realiza directamente empleando un sistema de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, en una reacción que sólo procede en presencia de  $\text{NADP}^+$ . El equilibrio está muy desplazado en la dirección de formación del NADPH, constituyendo una reacción prácticamente irreversible. La formación de NADPH seguida por el incremento de la densidad óptica a 340 nm es cuantitativamente dependiente del contenido en NADP del extrac



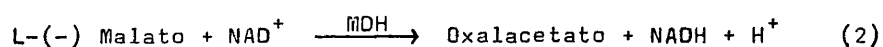
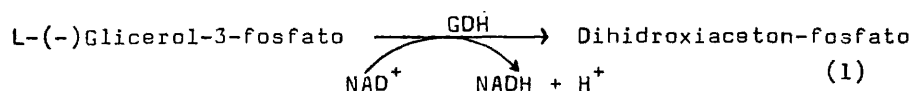
to problema.

Las concentraciones finales de los diferentes reactivos en la cubeta de reacción fueron: Tampón trietanolamina/Mg<sup>++</sup> pH 7,6, 18,5 mM; EDTA 1,85 mM; glucosa 6-fosfato 1,85 mM; - ditioeritritol 0,4 mM; G6PDH 7,6 µg.

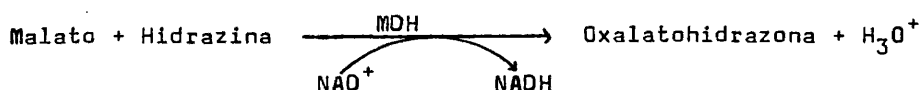
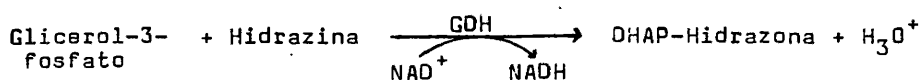
#### 3.2.5.12.- α-Glicerolfosfato y malato:

Las determinaciones se llevaron a cabo espectrofotométricamente, acoplando entre sí las técnicas de Michal y Lang (1974) y Gutmann y Wahlefeld (1974).

#### Fundamento:



Tanto la reacción (1) como la (2), se encuentran ampliamente desplazadas hacia la izquierda. Este inconveniente se salva empleando un tampón en la región alcalina (pH 9,1) que va eliminando los protones a medida que se forman, y añadiendo hidrazina que retira los productos con grupo carbonilo al estado de hidrazona.



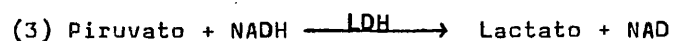
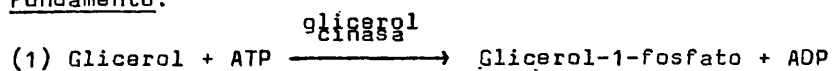
De esta manera se consigue desplazar ambos equilibrios hacia la derecha, de manera que la formación de NADH, y el aumento correspondiente en la densidad óptica a 340 nm, son una medida cuantitativa del glicerofosfato y malato presentes en el extracto.

La concentración final de los diferentes reactivos en la cubeta resultó ser: Tampón Tris-ClH pH 9,1 37 mM; Hidrazina 0,15 M; MgSO<sub>4</sub> 3,7 mM; EDTA 1,85 mM; NAD 1,12 mM; GDH 7,6 µg; MDH 7,6 µg.

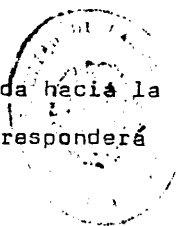
### 3.2.5.13.- Glicerol:

Se determinó por el método de Lagunas y McLean (1970).

#### Fundamento:



Como la reacción (3) está fuertemente desplazada hacia la formación de lactato, cada mol de NADH oxidado corresponderá equimolecularmente al glicerol-1-fosfato formado.



La concentración final de los diferentes reactivos fue:  
Tampón Trietanolamina pH 7,6 0,1 M; NADH 0,21 mM; fosfoeno-  
pirúvico 1,1 mM; KCl 0,1 M;  $MgSO_4$  30 mM; ATP/Mg 3 mM; LDH  
7,6  $\mu$ g; PK 7,6  $\mu$ g; Glick 20  $\mu$ g.

#### 3.2.5.14.- Citrato.

El método empleado es el propuesto por Dagley (1974).

##### Fundamento:

Piruvato + NADH  $\xrightarrow{\text{LDH}}$  Lactato + NAD

Oxalacetato + NADH  $\xrightarrow{\text{MDH}}$  Malato + NAD

Citrato  $\xrightarrow{\text{CL}}$  Oxalacetato

Con la láctico deshidrogenasa se valora el piruvato, con la malato deshidrogenasa se valora el oxalacetato y posteriormente se añade citrato liasa, la cual nos da la concentración de citrato como oxalacetato.

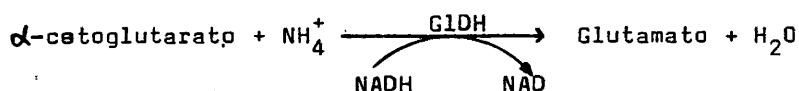
La concentración final de los diferentes reactivos en la cubeta resultó ser: Tampón Trietanolamina/Magnesio pH 7,6 0,2 M; NADH 0,21 mM; Ditioeritritol 0,2 mM; LDH 7,6  $\mu$ g; MDH 7,6  $\mu$ g; CL 20  $\mu$ g.

#### 3.2.5.15.- Amonio libre.

Se determinó empleando el método descrito por Fonseca-Wollheim y cols (1974).

#### Fundamento:

La determinación espectrofotométrica se realiza directamente midiendo la disminución en la densidad óptica a 340 nm debido a la oxidación del NADH según la reacción siguiente:



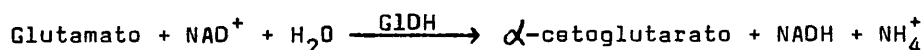
Se debe emplear la enzima glutamato deshidrogenasa suspendida en glicerol para evitar interferencias en la determinación.

La concentración final de los diferentes reactivos en la cubeta resultó ser: Tampón fosfato pH 7,4 37 mM; NADH 0,21 mM; KG 15 mM; ADP 2 mM; G1DH en glicerol 20 µg.

#### 3.2.5.16.- Glutamato.

Se determinó por el método de Bernt y Bergmeyer (1974).

#### Fundamento:



La determinación espectrofotométrica se realiza directamente midiendo el incremento de la densidad óptica a 340 nm, debido a la formación de NADH en el medio.

Para lograr que el equilibrio de la reacción se desplace hacia la derecha, utilizamos Tampón Tris Hidrazina a pH 9,1 y se añade una elevada concentración de NAD.

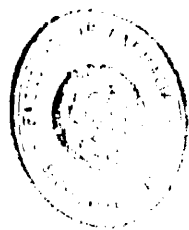
La concentración final de los diferentes reactivos en la cubeta resultó ser: Tampón Tris-ClH pH 9,1 37 mM; Hidrazina 0,15 M; MgSO<sub>4</sub> 3,7 mM; EDTA 1,85 mM; NAD 2,2 mM; G1DH 20 µg.

#### 3.2.5.17.- Proteínas solubles.

La valoración de las proteínas se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Lowry y cols (1951), empleando como patrón albúmina de la casa Sigma.

Las determinaciones se realizaron sobre diluciones del extracto original, bien fracción soluble o mitocondrial, que cayeron dentro del rango de la curva patrón. La cifra final es la media de las dos calculadas por interpolación sobre la curva.

4.- RESULTADOS



4.1.- Variaciones en el incremento de peso corporal y en la relación peso hígado-peso cuerpo en ratas sometidas a los diferentes tratamientos de etanol y/o acetaldehído y dieta grasa durante tres meses.

Cada rata en los diferentes lotes fué sometida semanalmente a control de peso corporal, registrándose los incrementos de peso y comparándolos con los relativos del lote control.

En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos a los tres meses de tratamiento. El incremento control resultó ser un 209% del peso inicial del mismo lote. Los otros lotes mostraron incrementos menores siendo muy significativos ( $p < 0,001$ ) las diferencias de todos ellos al referirlos al control. Los valores más bajos correspondieron a los lotes etanol más grasa (109%) y etanol más acetaldehído (133%). La diferencia entre etanol (189%) y acetaldehído (150%) resultó significativa con  $p < 0,05$ .

La tabla 2 presenta los resultados obtenidos para el cociente peso hígado/peso cuerpo. La hipertrofia hepática fué mayor en el caso etanol + grasa con valores de 139% ( $p < 0,001$ ). La diferencia entre etanol y acetaldehído fué significativa ( $p < 0,02$ ) con valores superiores para el etanol.



T A B L A I

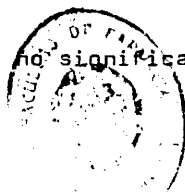
INCREMENTO DE PESO CORPORAL DE RATAS SOMETIDAS A DIFERENTES TRATAMIENTOS DE ETANOL Y ACETALDEHIDO DURANTE TRES MESES.

Condición	Peso inicial	Peso final	$\frac{\text{Peso final}}{\text{Peso inicial}} \times 100$	p	
Control (I)	181 $\pm$ 23	379 $\pm$ 26	209		
Etanol (II)	165 $\pm$ 25	312 $\pm$ 40	189	v.I	0,001
Etanol y grasa (III)	185 $\pm$ 20	202 $\pm$ 15	109	v.I v.II	0,001 0,001
Grasa (IV)	194 $\pm$ 31	294 $\pm$ 64	152	v.I v.III	0,001 0,001
Etanol y acetaldehído (V)	188 $\pm$ 21	250 $\pm$ 29	133	v.I v.II	0,001 0,01
Acetaldehído (VI)	181 $\pm$ 26	272 $\pm$ 24	150	v.I v.II v.III	0,001 0,05 N.S.

Los resultados son media de 8 animales con sus desviaciones típicas.

La t de student fué calculada: II versus I, III versus I, III versus II; IV versus I; IV versus III; V versus I; V versus II, VI versus I, VI versus II y VI versus V.

Cuando este valor fué superior a 0,05 fué considerada no significativa.





T A B L A   I I

RELACION PESO HIGADO/PESO CUERPO DE RATAS SOMETIDAS A DIFERENTES TRATAMIENTOS DE ETANOL Y ACETALDEHIDO DURANTE TRES MESES.

Condición	Peso cuerpo	Peso hígado	$\frac{\text{Peso hígado}}{\text{Peso cuerpo}} \times 10^3$	%	p	
Control (I)	379 ±26	11,7	31 ± 3,2	100		
Etanol (II)	312 ±40	10,6	34 ± 3,4	110	v.I	0,05
Etanol y grasa (III)	202 ±15	11,6	43 ± 10,1	139	v.I v.II	0,001 0,01
Grasa (IV)	294 ±64	16,2	35 ± 3,5	113	v.I v.III	0,01 0,01
Etanol y acetaldehído (V)	250 ±29	8,3	33 ± 3,8	106	v.I v.II	N.S. N.S.
Acetaldehído (VI)	272 ±24	8,3	30 ± 4,5	97	v.I v.II v.V	N.S. 0,02 N.S.

Los resultados son media de 12 animales con sus desviaciones típicas. La t de student fué calculada: II versus I, III versus I, III versus II, IV versus I, IV versus III, V versus I, V versus II, VI versus I, VI versus II y VI versus V. Cuando este valor fué superior a 0,05 fué considerada no significativa.

4.2.- Variaciones en los niveles de proteínas solubles de las fracciones citosólica y mitocondrial en hígado de ratas sometidas a los diferentes tratamientos de etanol y/o acetaldehído y dieta grasa durante tres meses.

En las tablas 3 y 4 se recogen los valores de proteínas solubles en las fracciones citosólica y mitocondrial, respectivamente. Se determinaron según el método de Lowry y cols., (1951) y se consideró como fracción citosólica al sobrenadante obtenido después de centrifugar el homogenado hepático a 105.000 g. durante 45 minutos y como fracción mitocondrial al precipitado obtenido a 12.000 g (después de eliminados la fracción nuclear a 1.800 g) y lavado dos veces con el medio de extracción (ver apartado 3.2.3. de Métodos).

Las proteínas citosólicas resultaron significativamente disminuídas en el caso de etanol + grasa (73%,  $p < 0,001$ ). En las proteínas mitocondriales el lote correspondiente al acetaldehído dió los valores más bajos 87% aunque no significativos.



T A B L A   III

VARIACIONES EN LOS NIVELES DE PROTEINAS EN LA FRACCION CITOSO-LICA DE HIGADO DE RATA SOMETIDA A DIFERENTES TRATAMIENTOS CON ETANOL Y ACETALDEHIDO DURANTE TRES MESES.

Condición.	mg/g. hígado	%	p <	
Control (I)	90,4 ± 9	100		
Etanol (II)	86,2 ± 4,2	95	v.I	N.S.
Etanol y grasa (III)	66,3 ± 20	73	v.I v.II	0,01 0,02
Grasa (IV)	82,4 ± 14	91	v.I v.III	N.S. 0,05
Etanol y acetaldehído (V)	97,4 ± 14	108	v.I v.II	N.S. 0,05
Acetaldehído (VI)	100,6 ± 12	111	v.I v.II v.V	0,05 0,01 N.S.

Los resultados son media de 8 determinaciones experimentales, con sus desviaciones típicas.

La t de student fué calculada comparando las parejas de valores según se indica. Cuando este valor fué superior a 0,05 se consideró no significativo.

T A B L A IV

VARIACIONES EN LOS NIVELES DE PROTEINAS EN LA FRACCION MITOCONDRIAL DE HIGADO DE RATA SOMETIDA A DIFERENTES TRATAMIENTOS CON ETANOL Y ACETALDEHIDO DURANTE TRES MESES.

Condición	mg/g. hígado	%	p <	
Control (I)	43,4 ± 3,6	100		
Etanol (II)	43,6 ± 3	100	v.I	N.S.
Etanol y grasa (III)	43,8 ± 4	101	v.I v.II	N.S. N.S.
Grasa (IV)	36,5 ± 4	84	v.I v.III	0,001 0,01
Etanol y acetaldehído (V)	38,4 ± 3	88	v.I v.II	0,01 0,01
Acetaldehído (VI)	37,8 ± 4	87	v.I v.II v.V	0,01 0,01 N.S.

Los resultados son media de 8 determinaciones experimentales, con sus desviaciones típicas.

La t de student fué calculada comparando las parejas de valores según se indica. Cuando este valor fué superior a 0,05 se consideró no significativo.



4.3.- Niveles de metabolitos y actividades enzimáticas de la vía glucolítica de Embden-Meyerof en hígado de rata sometida a los diferentes tratamientos de etanol y/o acetaldehído y dieta grasa durante tres meses.

Relacionados con esta vía degradativa de la glucosa se han determinado, en liofilizados redisueltos de extracto hepático preparado según el apartado 3.2.5. de Métodos, los metabolitos siguientes: glucosa, glucosa-6-fosfato, fructosa-6-fosfato,  $\alpha$ -glicerofosfato, 3-fosfoglicerato, piruvato y lactato, que fueron determinados siguiendo los métodos citados en los apartados 3.2.5.2; 3.2.5.3.; 3.2.5.4.; 3.2.5.5 y 3.2.5.12.

En las tablas V, VI, VII, VIII, IX, X y XI se muestran los resultados de cada uno de estos metabolitos respectivamente, expresados en nanomoles por gramo de tejido fresco.

En las figuras 1 - 10 aparecen estos resultados expresados en % según las diferentes condiciones experimentales de parejas de grupos comparados entre sí. Figura 1 etanol/control; - Figura 2 etanol + grasa/control; Figura 3 grasa/control; Figura 4 etanol + acetaldehído/control; Figura 5 acetaldehído/control; Figura 6 etanol + grasa/etanol; Figura 7 etanol + grasa/grasa; Figura 8 etanol + acetaldehído/etanol; Figura 9 etanol + acetaldehído/acetaldehído; Figura 10 acetaldehído/etanol.

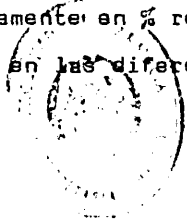
En las tablas XII, XIII, XIV y XV se muestran los resultados de los cuatro isoenzimas de la ATP hexosa fosfotransferasa (hexoquinasas I, II, III y IV) determinados por el método de Grossbard y Schimke, 1966 y calculado su perfil isoenzimático por el de - Gumaa y McLean, 1972. El efecto del etanol y/o acetaldehído fue muy manifiesto sobre la hexocinasa IV (glucocinasa) que presentó valores muy significativamente disminuidos respecto al control (30%  $p < 0,001$ ; 11%  $p < 0,001$  y 45%  $p < 0,001$ ) para etanol, etanol + acetaldehído y acetaldehído, respectivamente. La alimentación grasa con y sin etanol dió también valores significativamente disminuidos (30%  $p < 0,001$  y 40%  $p < 0,001$ , respectivamente).

La hexocinasa III llegó a valores nulos en el caso de etanol + grasa, etanol + acetaldehído y acetaldehído. Etanol (47%  $p < 0,01$ ) y grasa (15%  $p < 0,001$ ) mostraron también significativa disminución de esta actividad.

La hexocinasa I apareció incrementada significativamente por efecto del acetaldehído (138%  $p < 0,01$ ) y el acetaldehído + etanol (140%  $p < 0,01$ ).

La hexocinasa II mostró valores elevados muy significativamente en todos los casos siendo los más elevados los correspondientes a etanol + grasa (613%  $p < 0,001$ ) y etanol + acetaldehído (568%,  $p < 0,001$ ).

En la figura 11 aparece representado gráficamente en % respecto al control el perfil de las 4 hexocinasas en las diferentes condiciones de experimentación.



En la tabla XVI se muestra la actividad de la fosfofructo-  
cinasa (2ª enzima clave de la glucólisis), determinada según  
Baquer y cols. 1976 (apartado 3.2.4.2.). El efecto del etanol  
(75%  $p < 0,05$ ); etanol + grasa (63%  $p < 0,001$ ); grasa (74% -  
 $p < 0,02$ ) y etanol + acetaldehído (61%  $p < 0,001$ ), hizo dismi-  
nuir significativamente la actividad de este enzima.

En la tabla XVII se muestra la actividad de la aldolasa -  
determinada según Bergmeyer<sup>1</sup> cols (1974) (apartado 3.2.4.3.).  
Esta actividad se mostró significativamente incrementada por 9  
efecto del etanol (166%,  $p < 0,001$ ); etanol + grasa (147%, -  
 $p < 0,001$ ) y grasa 148%,  $p < 0,01$ ). El acetaldehído con y sin -  
etanol no provocó variaciones en este enzima.

En la tabla XVIII se muestra la actividad de la piruvato  
cinasa (tercer enzima clave de la glucólisis) que fué determi-  
nada según el método de Bergmeyer (1974) (apartado 3.2.4.4.).

Los valores más significativamente bajos se registraron en  
el caso de grasa + etanol (29%  $p < 0,001$ ), grasa (41%,  $p < 0,001$ ),  
etanol + acetaldehído (41%  $p < 0,001$ ) y acetaldehído (66% -  
 $p < 0,02$ ). El etanol por sí solo produjo una disminución no sig-  
nificativa de esta actividad (81%).

En la tabla XIX aparece la actividad de la  $\alpha$ -glúcerofosfa-  
to deshidrogenasa (enzima no propiamente glucolítico) que fué  
determinado en la fracción soluble por el método de Bergmeyer  
(1974) (apartado 3.2.4.5.). Todas las actividades aparecieron  
significativamente incrementados especialmente los correspon-  
diente al etanol (206%) y acetaldehído (186%).

T A B L A   V

VARIACION DE LOS NIVELES DE GLUCOSA EN HIGADO DE RATA SOMETIDA A DIFERENTES TRATAMIENTOS CON ETANOL Y/O ACETALDEHIDO Y DIETA GRASA DURANTE TRES MESES.

Condición	nmoles/g hígado	%	p <	
Control (I)	4469 ± 724	100		
Etanol (II)	4239 ± 981	95	v.I	NS
Etanol y grasa (III)	3342 ± 757	75	v.I    0,01 v.II   0,05	
Grasa (IV)	3410 ± 1029	76	v.I    0,05 v.III NS	
Etanol y acetaldehido (V)	3695 ± 560	83	v.I    0,05 v.II   NS	
Acetaldehido (VI)	3600 ± 1462	81	v.I    NS v.II   NS v.V    NS	

Los resultados son media de 8 determinaciones experimentales con sus desviaciones típicas.

La t de student fué calculada comparando las parejas de resultados según se indica. Cuando este valor fué superior a 0,05 se consideró no significativo.



T A B L A VI

VARIACIONES EN LOS NIVELES DE GLUCOSA-6-FOSFATO EN HIGADO DE RATA  
SOMETIDA A DIFERENTES TRATAMIENTOS CON ETANOL Y/O ACETALDEHIDO  
Y DIETA GRASA DURANTE TRES MESES.

Condición	nmoles/g hígado	%	p <
Control (I)	391 ± 28	100	..
ETANOL (II)	570 ± 63	146	v.I o 0,001
Etanol y Grasa (III)	456 ± 38	117	v.I 0,05 v.II 0,001
Grasa (IV)	249 ± 29	64	v.I 0,001 v.III 0,001
Etanol y acetaldehido (V)	621 ± 59	159	v.I 0,001 v.II NS
Acetaldehido (VI)	654 ± 94	167	v.I 0,001 v.II NS v.V NS

Los resultados son media de 8 determinaciones experimentales con sus desviaciones típicas.

La t de student fué calculada comparando las parejas de resultados según se indica. Cuando este valor fué superior a 0,05 se consideró no significativo.

T A B L A    VII

VARIACIONES EN LOS NIVELES DE FRUCTOSA-6-FOSFATO EN HIGADO DE RATA SOMETIDA A DIFERENTES TRATAMIENTOS CON ETANOL Y/O ACETALDEHIDO Y DIETA GRASA DURANTE TRES MESES.

Condición	nmoles/g hígado	%	p <	
Control (I)	55 ± 3	100		
Etanol (II)	73 ± 11	132	v.I	0,05
Etanol y grasa (III)	59 ± 6	110	v.I    NS v.II   NS	
Grasa (IV)	39 ± 7	70	v.I    0,001 v.III 0,01	
Etanol y acetaldehido (V)	112 ± 17	200	v.I    0,001 v.II   0,02	
Acetaldehido (VI)	114 ± 10	210	v.I    0,001 v.II   0,05 v.V    NS	

Los resultados son media de 8 determinaciones experimentales con sus desviaciones típicas.

La t de student se calculó comparando las parejas de resultados según se indica. Cuando este valor fué superior a 0,05 se consideró no significativo.



# T A B L A VIII

VARIACIONES EN LOS NIVELES DE  $\alpha$ -GLICEROFOSFATO EN HIGADO DE RATA  
SOMETIDA A DIFERENTES TRATAMIENTOS DE ETANOL Y/O ACETALDEHIDO Y  
DIETA GRASA DURANTE TRES MESES.

Condición	nmoles/g hígado	%	p <	
Control (I)	155 $\pm$ 33	100		
Etanol (II)	588 $\pm$ 217	379	v.I	0,001
Grasa y etanol (III)	250 $\pm$ 77	161	v.I v.II	0,02 0,01
Grasa (IV)	134 $\pm$ 44	86	v.I v.III	NS 0,001
Etanol y acetaldehido (V)	543 $\pm$ 345	350	v.I v.II	0,02 NS
Acetaldehido (VI)	333 $\pm$ 75	215	v.I v.II v.V	0,001 0,02 NS

Los resultados son media de 8 determinaciones experimentales con  
sus desviaciones típicas.

La t de student fué calculada comparando las parejas de valores  
según se indica. Cuando este valor fué superior a 0,05 se consi-  
deró no significativo.

T A B L A IX

VARIACIONES EN LOS NIVELES DE 3-FOSFOGLICERATO EN HIGADO DE RATA SOMETIDA A LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS CON ETANOL Y/O ACETALDEHIDO Y DIETA GRASA DURANTE TRES MESES.

Condición	nmoles/g hígado	%	p <	
Control (I)	179 ± 48	100		
Etanol (II)	182 ± 31	102	v.I	NS
Etanol y grasa (III)	202 ± 23	113	v.I v.II	NS NS
Grasa (IV)	170 ± 25	95	v.I v.III	NS 0,05
Etanol y acetaldehido (V)	162 ± 41	91	v.I v.II	NS NS
Acetaldehido (VI)	184 ± 45	103	v.I v.II v.V	NS NS NS

Los resultados son media de 8 determinaciones experimentales con sus desviaciones típicas.

La t de student fué calculada comparando parejas de resultados según se indica. Cuando este valor fué superior a 0,05 se consideró no significativo.

# T A B L A X

VARIACION DE LOS NIVELES DE PIRUVATO EN HIGADO DE RATA SOMETIDA A DIFERENTES TRATAMIENTOS CON ETANOL Y/O ACETALDEHIDO Y DIETA GRASA DURANTE TRES MESES.

Condición	nmoles/g hígado	%	p <
Control (I)	101 ± 11	100	
Etanol (II)	52 ± 11	52	v.I 0,001
Etanol y grasa (III)	67 ± 19	66	v.I 0,01 v.II NS
Grasa (IV)	79,5 ± 18	79	v.I 0,02 v.III NS
Etanol y acetaldehido (V)	30 ± 8	30	v.I 0,001 v.II 0,01
Acetaldehido (VI)	76 ± 10	75	v.I 0,01 v.II 0,01 v.V 0,001

Los resultados son media de 8 determinaciones experimentales con sus desviaciones típicas.

La t de student se calculó comparando las parejas de resultados según se indica. Cuando este valor fué superior a 0,05 se consideró no significativo.



T A B L A    X I

VARIACIONES EN LOS NIVELES DE LACTATO EN HIGADO DE RATA SOMETIDA A DIFERENTES TRATAMIENTOS CON ETANOL Y/O ACETALDEHIDO Y DIETA GRASA DURANTE TRES MESES.

Condición	nmoles/g hígado	%	p <	
Control (I)	804 ± 121	100		
Etanol (II)	1456 ± 504	181	v.I	0,01
Etanol y grasa (III)	695 ± 294	87	v.I v.II	NS 0,01
Grasa (IV)	543 ± 111	68	v.I v.III	0,001 NS
Etanol y acetaldehido (V)	1435 ± 505	178	v.I v.II	0,01 NS
Acetaldehido (VI)	1369 ± 359	170	v.I v.II v.V	0,001 NS NS

Los resultados son media de 8 determinaciones experimentales con sus desviaciones típicas.

La t de student fué calculada comparando las parejas de valores según se indica. Cuando este valor fué superior a 0,05 se consideró no significativo.



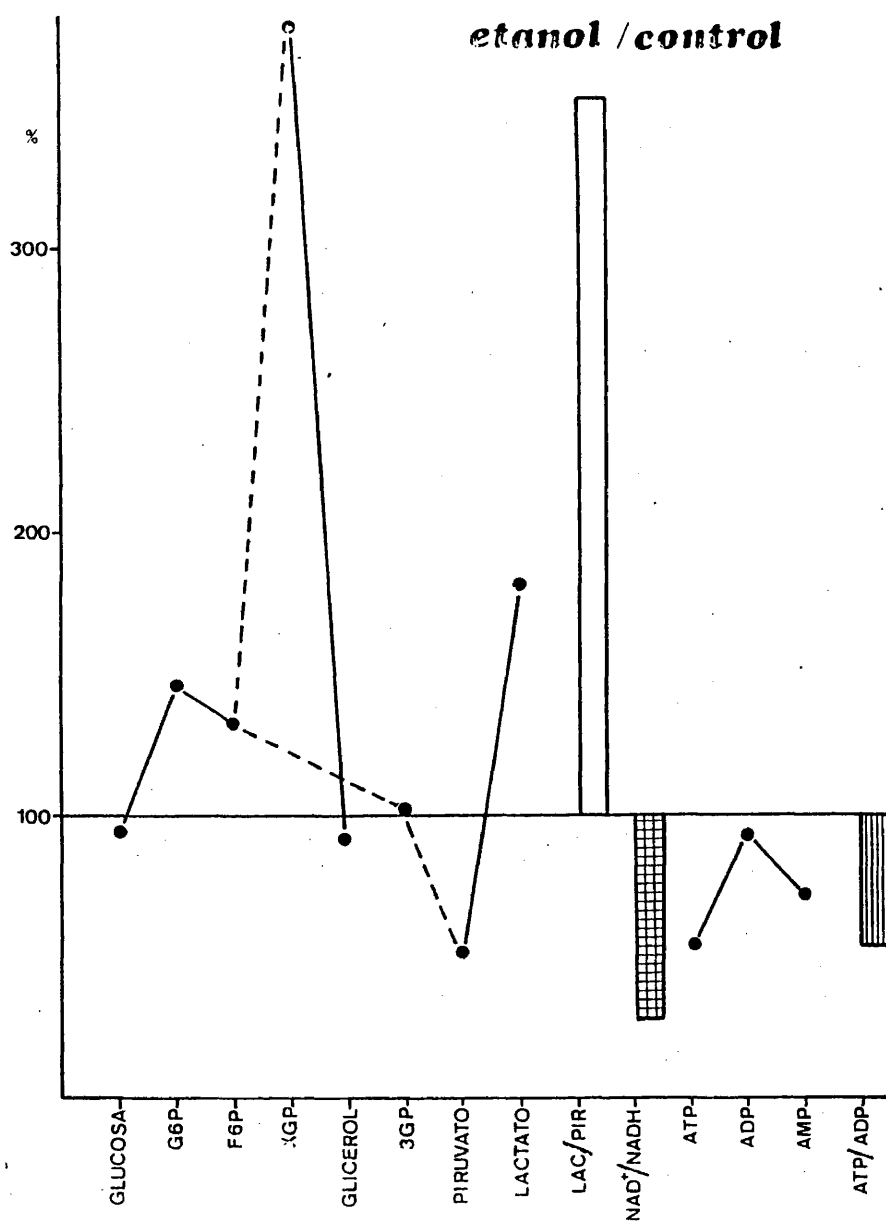


Figura 1.- Variaciones de metabolitos glucolíticos y adenin nucleótidos en hígado de rata. Los resultados están expresados en % etanol versus control.

**etanol + grasa / control**

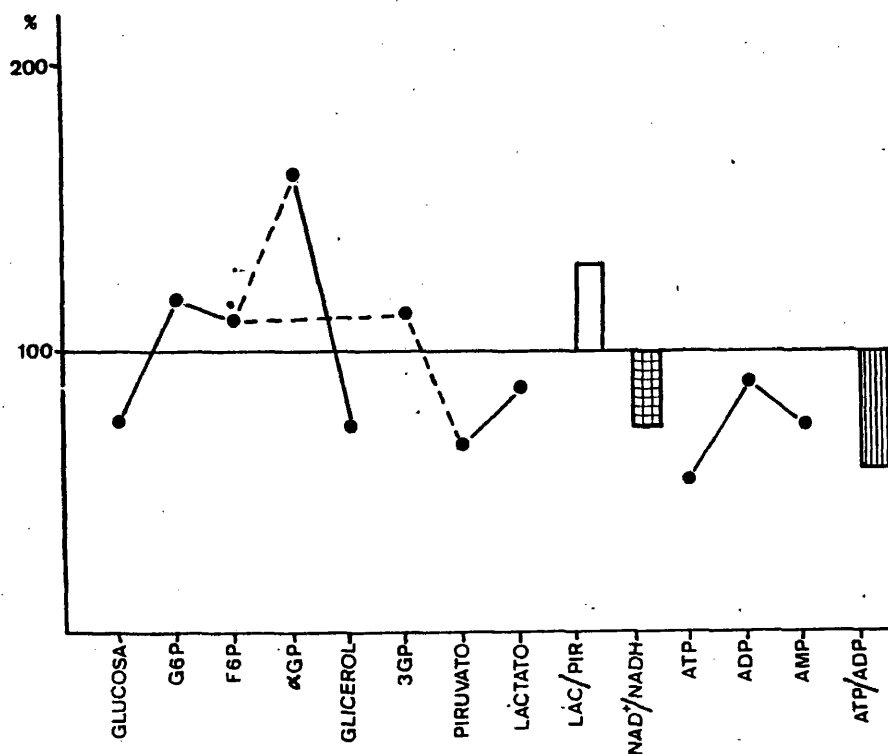


Figura 2.- Variaciones de metabolitos glucolíticos y adenin nucleótidos en hígado de rata. Los resultados están expresados en % etanol + grasa versus control



**grasa / control**

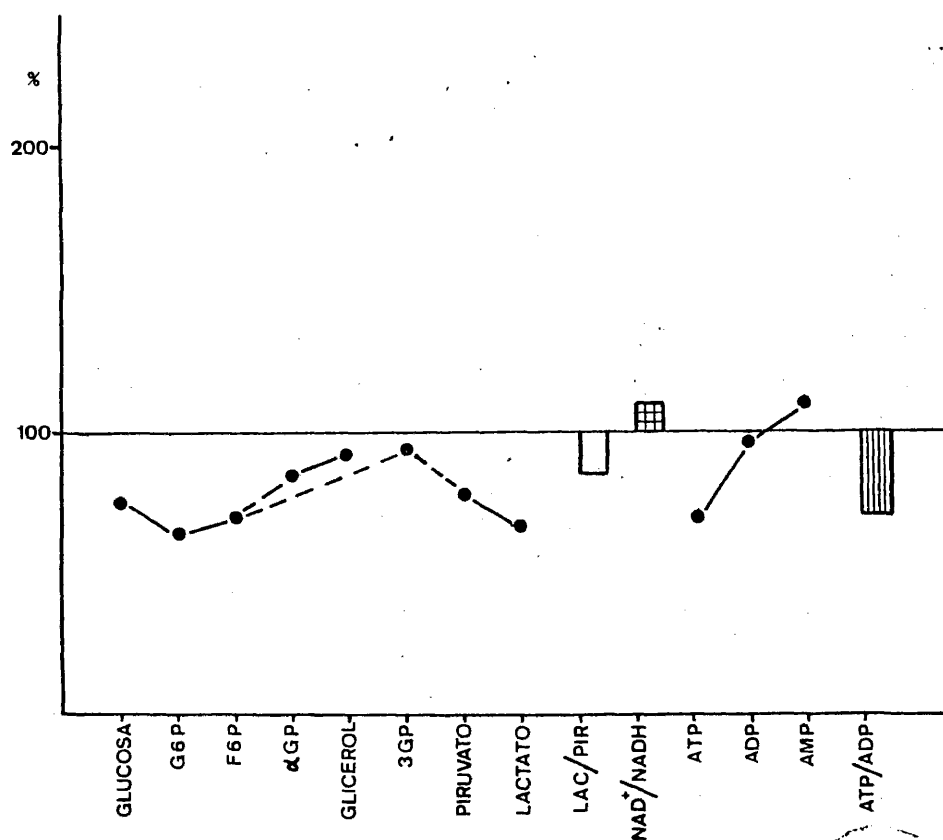


Figura 3.- Variaciones de metabolitos glucolíticos y adenín nucleótidos en hígado de rata. Los resultados es tán expresados en % grasa versus control.

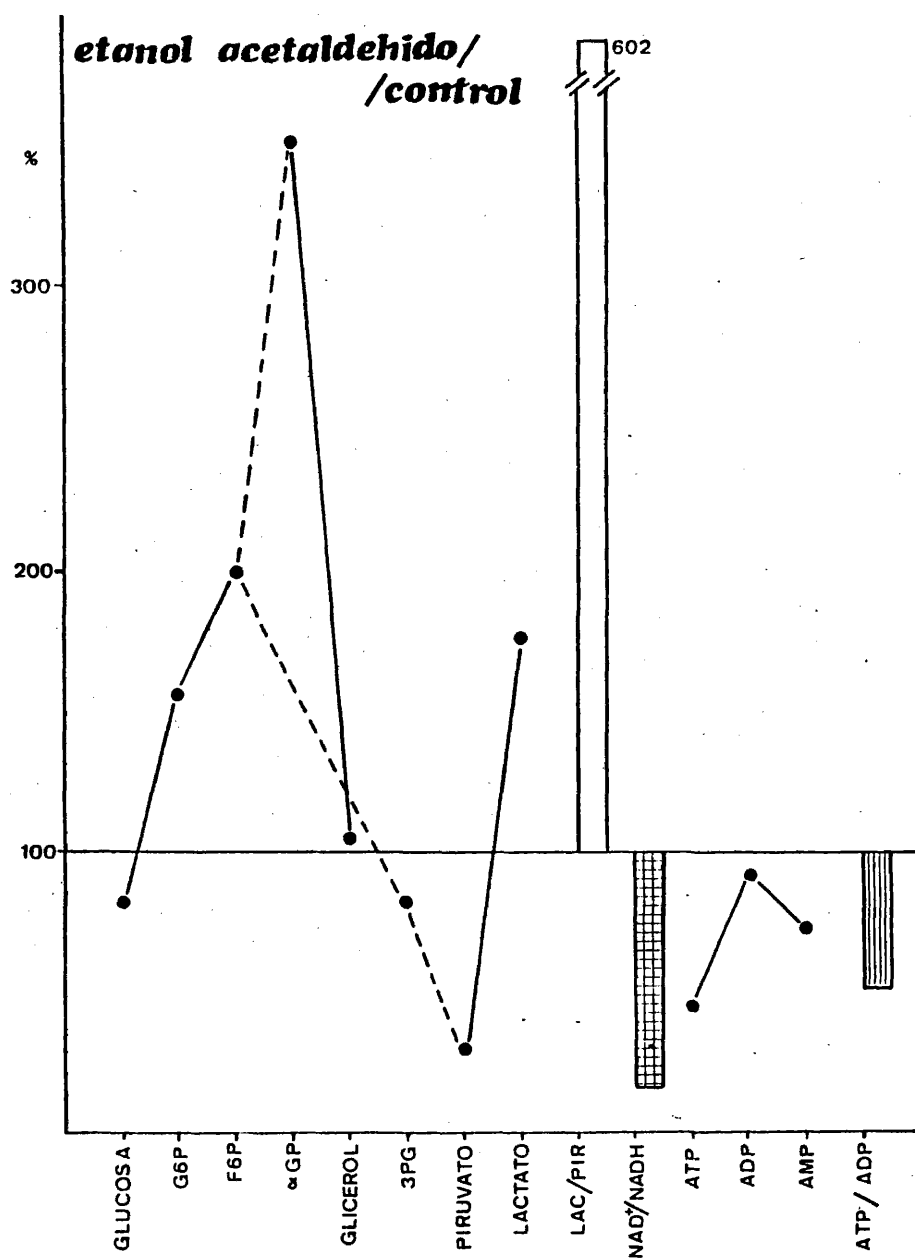


Figura 4.- Variaciones de metabolitos glucolíticos y adenin nucleótidos en hígado de rata. Los resultados están expresados en % etanol + acetaldehído versus control.

# **acetaldehído/control**

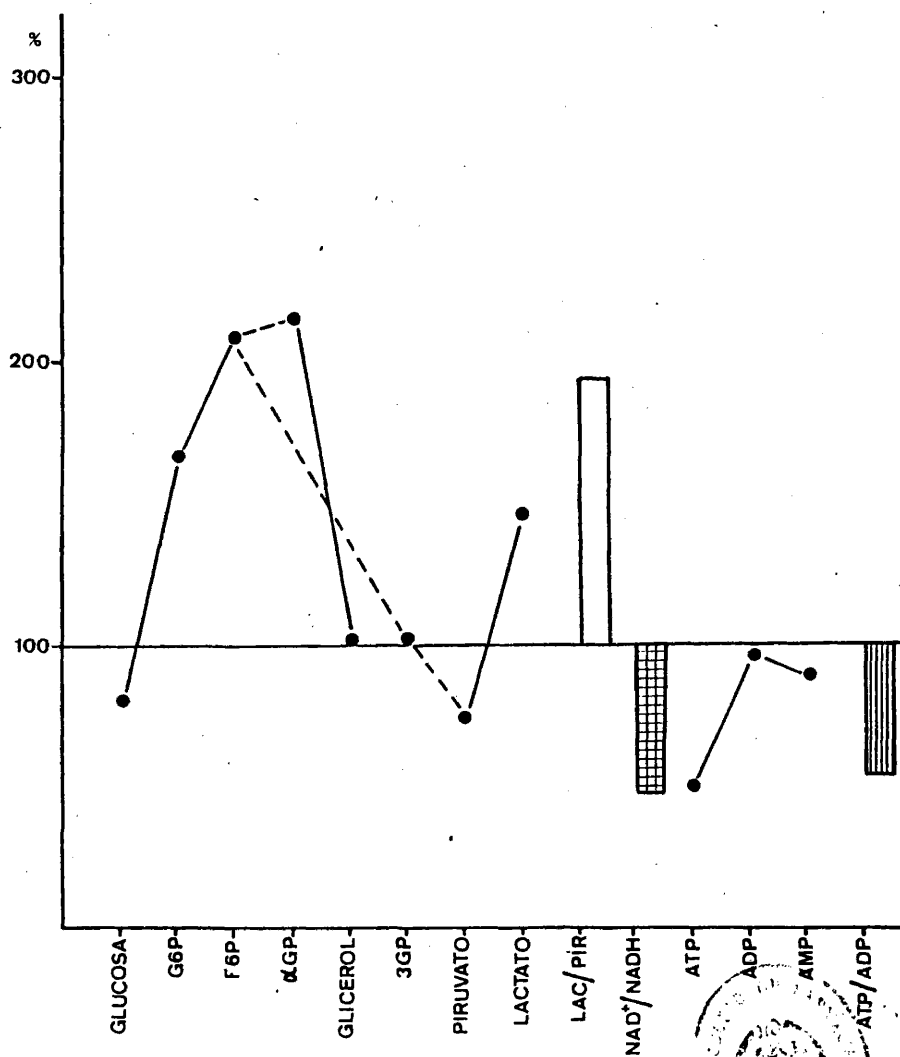


Figura 5.- Variaciones de metabolitos glucolíticos y adenin nucleótidos en hígado de rata. Los resultados están expresados en % acetaldehído versus control.

**etanol + grasa / etanol**

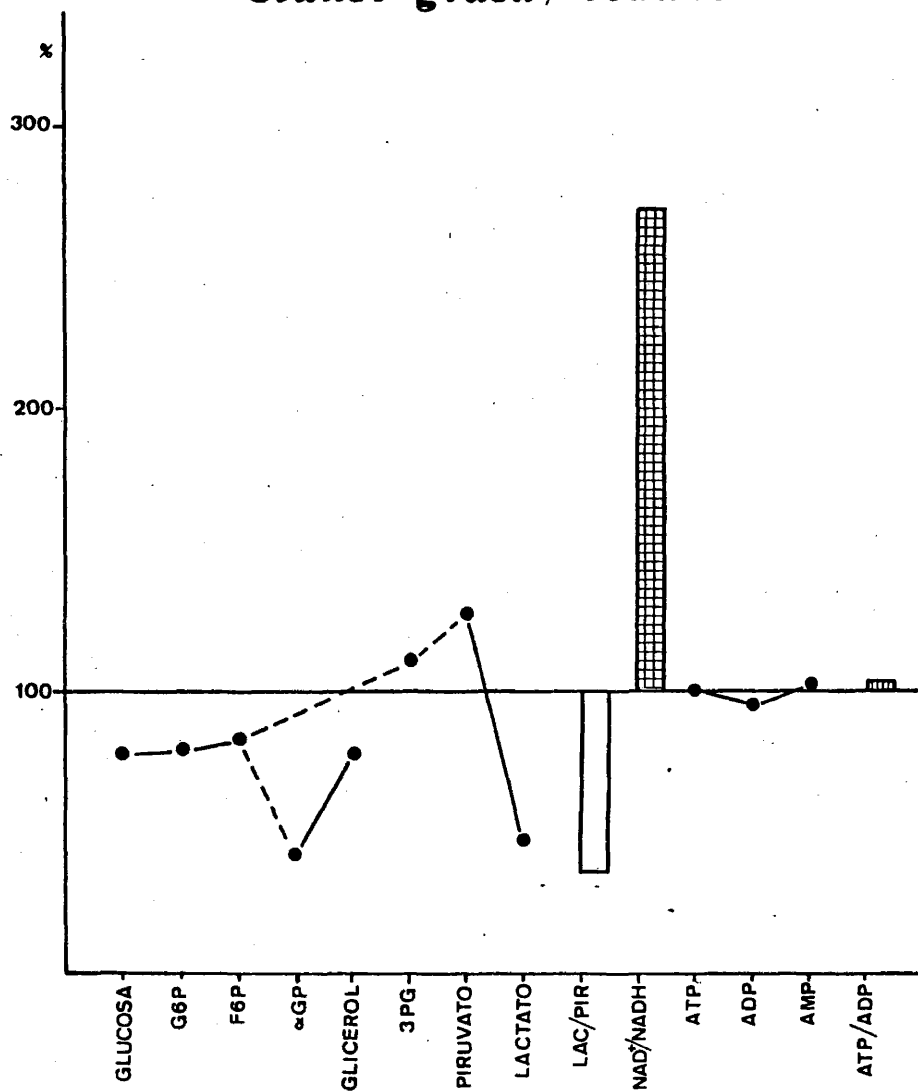


Figura 6.- Variaciones de metabolitos glucolíticos, y adenin nucleótidos en hígado de rata. Los resultados están expresados en % etanol + grasa versus etanol.

**etanol + grasa / grasa**

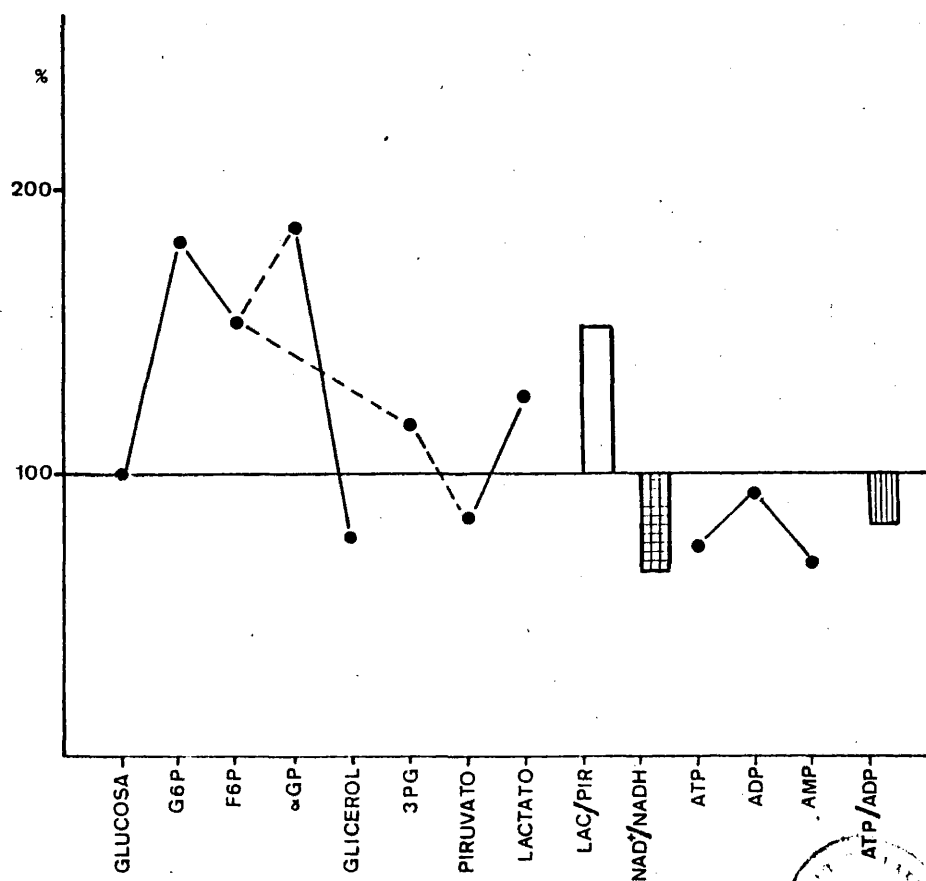


Figura 7.- Variaciones de metabolitos glucolíticos y adenín nucleótidos en hígado de rata. Los resultados es tán expresados en % etanol + grasa versus grasa.

**etanol + acetaldehído / etanol**

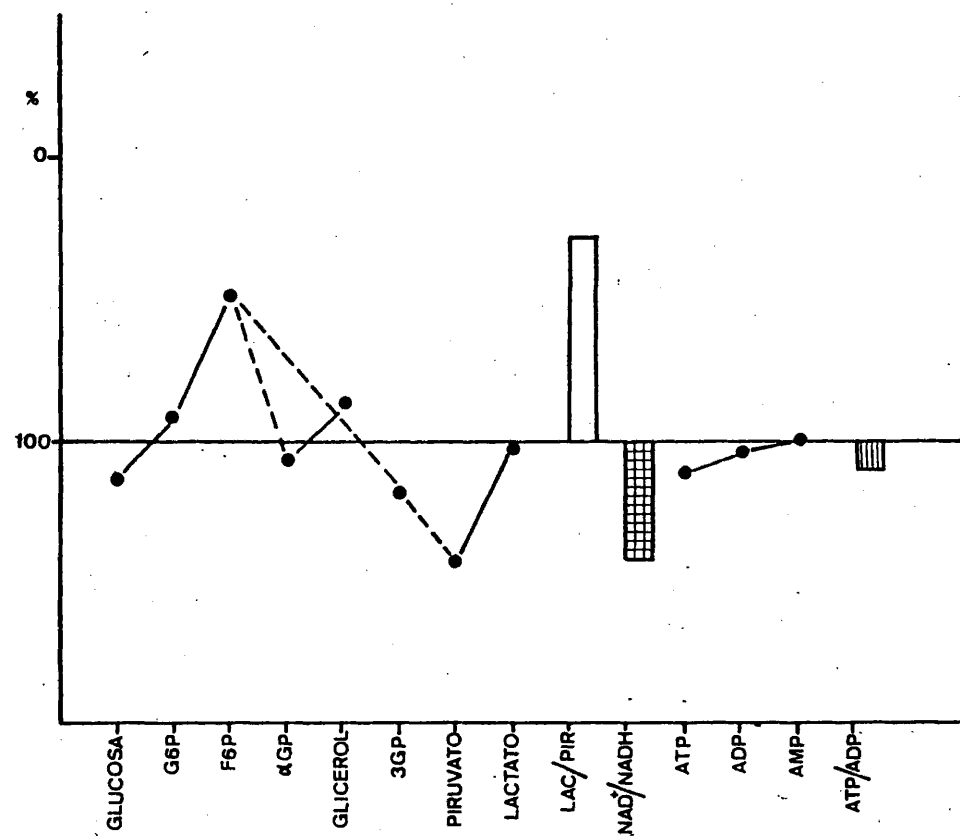


Figura 8.- Variaciones de metabolitos glucolíticos y adenin nucleótidos en hígado de rata. Los resultados es<sub>u</sub> tán expresados en % etanol + acetaldehído versus etanol.

**etanol + acetaldehído / acetaldehído**

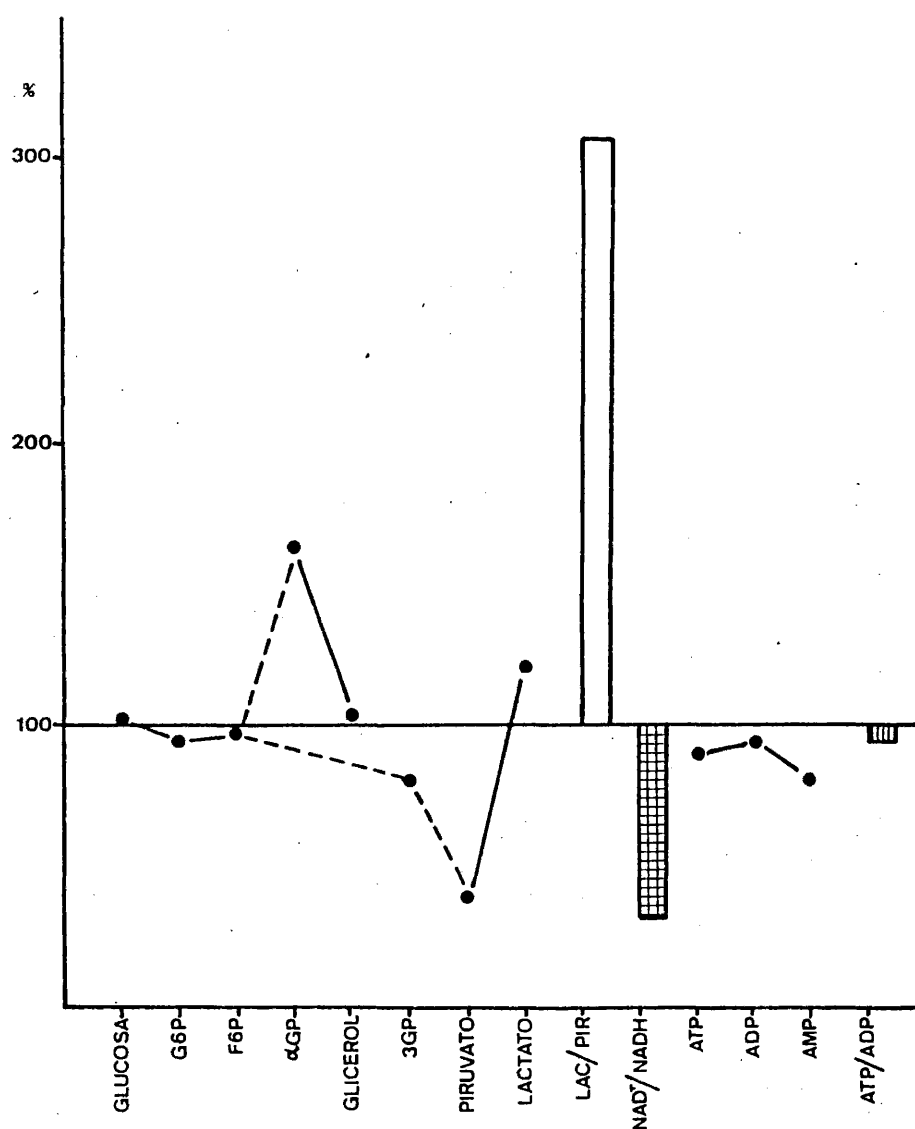


Figura 9.- Variaciones de metabolitos glucolíticos y adenin nucleótidos en hígado de rata. Los resultados están expresados en % etanol + acetaldehído versus acetaldehído.

## acetaldehído / etanol

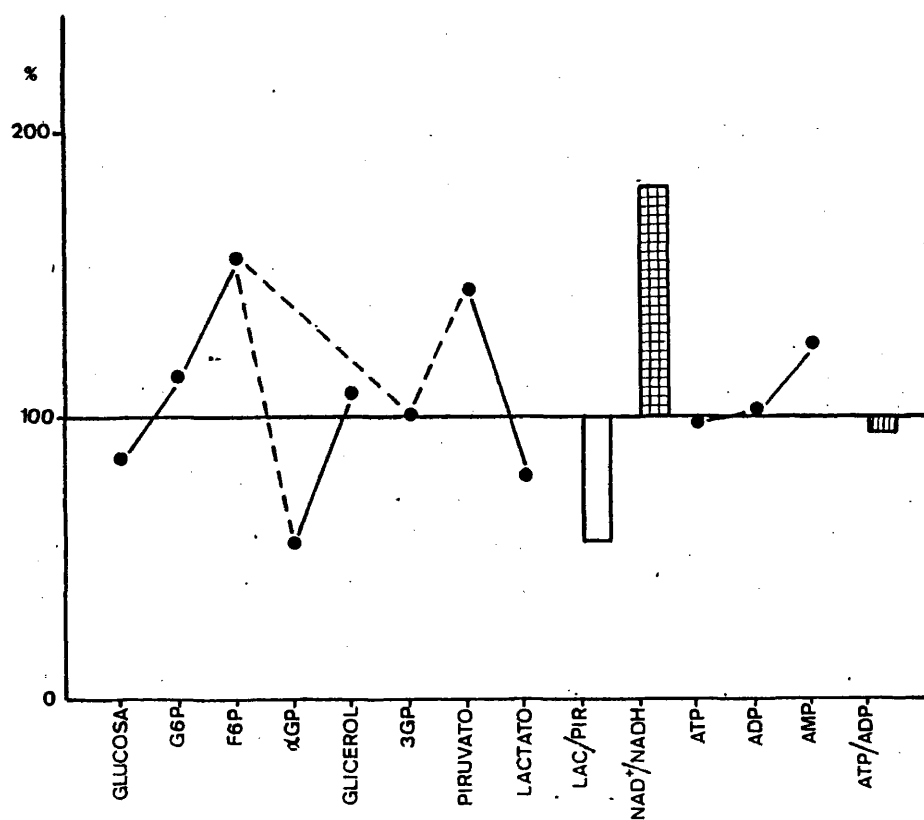


Figura 10.- Variaciones de metabolitos glucolíticos y adenin nucleótidos en hígado de rata. Los resultados están expresados en % acetaldehído versus etanol.



T A B L A XII

VARIACIONES EN LA ACTIVIDAD DE LA HEXOCINASA I EN HIGADO DE RATA  
SOMETIDA A DIFERENTES TRATAMIENTOS CON ETANOL Y/O ACETALDEHIDO  
Y DIETA GRASA DURANTE TRES MESES.

Condición	Us/ g Hígado	%	p <	
Control (I)	0,258 ± 0,011	100		
Etanol (II)	0,269 ± 0,011	104	v.I	NS
Etanol y grasa (III)	0,289 ± 0,073	112	v.I	NS
			v.II	NS
Grasa (IV)	0,264 ± 0,018	102	v.I	NS
			v.III	NS
Etanol y acetaldehido (V)	0,360 ± 0,053	140	v.I	0,01
			v.II	0,02
Acetaldehido (VI)	0,355 ± 0,049	138	v.I	0,01
			v.II	0,02
			v.V	NS

Los resultados son media de 8 determinaciones experimentales con sus desviaciones típicas.

La t de student fué calculada comparando las parejas de resultados según se indica. Cuando este valor fué superior a 0,05 se consideró no significativo.

T A B L A    XIII

VARIACIONES DE LA ACTIVIDAD HEXOCINASA II EN HIGADO DE RATA SOME-  
TIDA A DIFERENTES TRATAMIENTOS CON ETANOL Y/O ACETALDEHIDO Y DIETA  
GRASA.

Condición	Us/g hígado	%	p <
Control (I)	0,051 ± 0,029	100	
Etanol (II)	0,239 ± 0,083	468	v.I 0,01
Etanol y grasa (III)	0,313 ± 0,097	613	v.I 0,01 v.II NS
Grasa (IV)	0,113 ± 0,05	221	v.I NS v.III 0,001
Etanol y acetaldehido (V)	0,290 ± 0,039	568	v.I 0,001 v.II NS
Acetaldehido (VI)	0,193 ± 0,019	377	v.I 0,001 v.II NS v.V 0,01

Los resultados son media de 8 determinaciones experimentales con  
sus desviaciones típicas.

La t de student se calculó comparando las parejas de resultados  
según se indica. Cuando este valor fué superior a 0,05 fué consi-  
derado no significativo.



T A B L A XIV

VARIACIONES DE LA ACTIVIDAD DE LA HEXOCINASA III EN HIGADO DE RATA SOMETIDA A DIFERENTES TRATAMIENTOS CON ETANOL Y/O ACETALDEHIDO Y DIETA GRASA DURANTE TRES MESES.

Condición	US/g hígado	%	p <
Control (I)	0,230 ± 0,035	100	
Etanol (II)	0,110 ± 0,038	47	v.I 0,01
Etanol y grasa (III)	0		
Grasa (IV)	0,040 ± 0,056	15	v.I 0,001 v.III NS
Etanol y acetaldehido (V)	0		
Acetaldehido (VI)	0		

Los resultados son media de 8 determinaciones experimentales con sus desviaciones típicas.

La t de student fué calculada comparando parejas de resultados según se indica. Cuando este valor fué superior a 0,05 se consideró no significativo.

T A B L A XV

VARIACIONES DE LA ACTIVIDAD HEXUCINASA IV (GLUCOCINASA) EN HIGADO DE RATA SOMETIDA A DIFERENTES TRATAMIENTOS CON ETANOL Y/O ACETALDEHIDO Y DIETA GRASA DURANTE TRES MESES.

Condición	Us/g hígado	%	p <
Control (I)	1,334 ± 0,121	100	
Etanol (II)	0,399 ± 0,129	30	v.I 0,001
Etanol y grasa (III)	0,409 ± 0,125	32	v.I 0,001 v.II NS
Grasa (IV)	0,539 ± 0,077	40	v.I 0,001 v.III NS
Etanol y acetaldehido (V)	0,150 ± 0,047	11	v.I 0,001 v.II 0,01
Acetaldehido (VI)	0,599 ± 0,096	45	v.I 0,001 v.II 0,05 v.V 0,001

Los resultados son media de 8 determinaciones experimentales con sus desviaciones típicas.

La t de student fué calculada comparando las parejas de resultados según se indica. Cuando este valor fué superior a 0,05 se consideró no significativo.

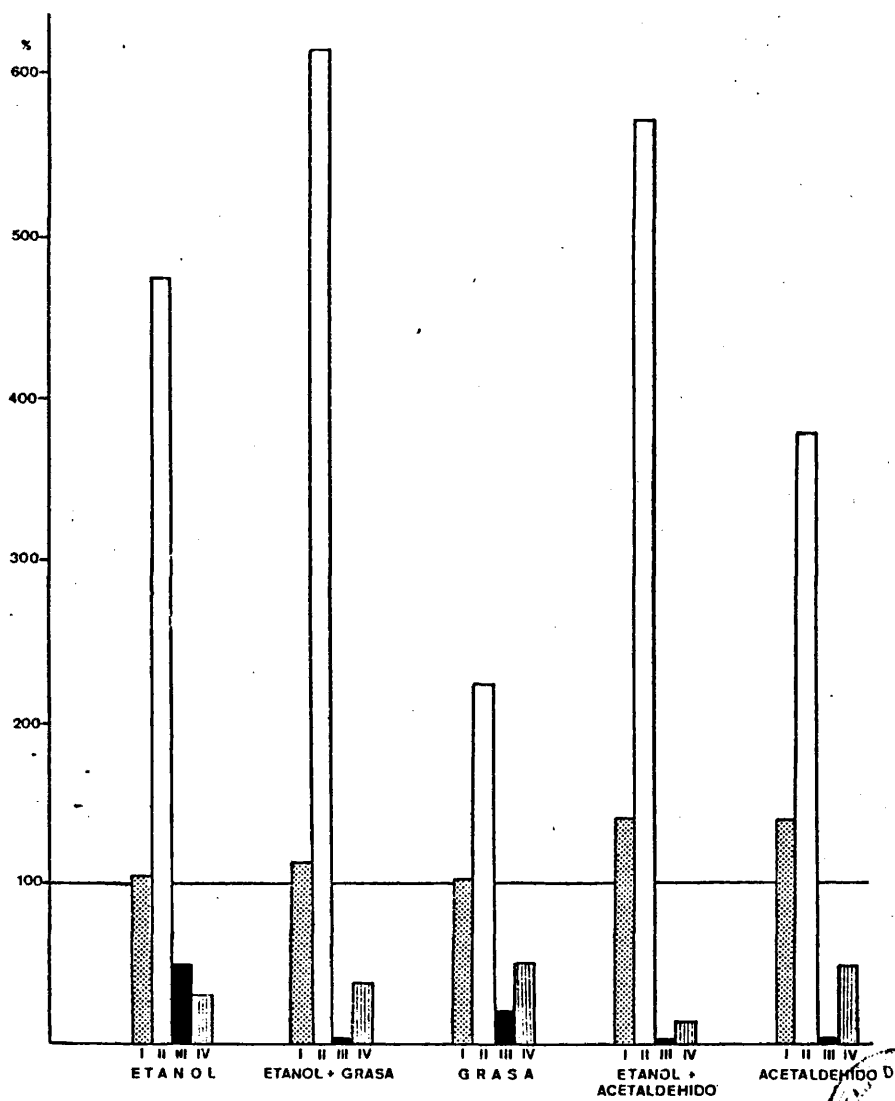


Figura 11.- Perfil isoenzimático de las hexocinasas. Los valores se expresan en % frente al control.

T A B L A    XVI

VARIACIONES EN LA ACTIVIDAD DE LA FOSFUFRUCTOCINASA EN HIGADO DE RATA SOMETIDA A DIFERENTES TRATAMIENTOS CON ETANOL Y/O ACETALDEHIDO Y DIETA GRASA DURANTE TRES MESES.

Condición	Us/g hígado	%	p <
Control (I)	2,27 ± 0,123	100	
Etanol (II)	1,70 ± 0,452	75	v.I    0,05
Etanol y grasa (III)	1,42 ± 0,130	63	v.I.. 0,001 v.II   NS
Grasa (IV)	1,68 ± 0,361	74	v.I    0,02 v.III NS
Etanol y acetaldehido (V)	1,39 ± 0,268	61	v.I    0,001 v.II   NS
Acetaldehido (VI)	1,87 ± 0,413	82	v.I    NS v.II   NS v.V    NS

Los resultados son media de 8 determinaciones experimentales con sus desviaciones típicas.

La t de student fué calculada comparando las parejas de resultados según se indica. Cuando este valor fué superior a 0,05 se consideró no significativo.

# T A B L A    XVII

VARIACIONES EN LA ACTIVIDAD DE LA ALDOLASA EN HIGADO DE RATA  
SOMETIDA A DIFERENTES TRATAMIENTOS CON ETANOL Y/O ACETALDEHIDO  
Y DIETA GRASA DURANTE TRES MESES.

Condición	Us/g hígado	%	p <	
Control (I)	13,15 ± 1,35	100		
Etanol (II)	21,84 ± 1,56	166	v.I	0,001
Etanol y grasa (III)	19,34 ± 2,08	147	v.I v.II	0,001 NS
Grasa (IV)	19,45 ± 2,42	148	v.I v.III	0,01 NS
Etanol y acetaldehido (V)	13,91 ± 1,84	106	v.I v.II	NS 0,001
Acetaldehido (VI)	13,58 ± 2,69	103	v.I v.II v.V	NS 0,001 NS

Los resultados son media de 8 determinaciones experimentales con sus desviaciones típicas.

La t de student fué calculada comparando las parejas de resultados según se indica. Cuando este valor fué superior a 0,05 se consideró no significativo.



T A B L A XVIII

VARIACIONES DE LA ACTIVIDAD DE LA PIRUVATOCINASA EN HIGADO DE RATA SOMETIDA A DIFERENTES TRATAMIENTOS CON ETANOL Y/O ACETALDEHIDO Y DIETA GRASA DURANTE TRES MESES.

Condición	Us/g hígado	%	p <	
Control (I)	13,04 ± 1,98	100		
Etanol (II)	10,60 ± 1,37	81	v.I	NS
Etanol y grasa (III)	3,80 ± 0,62	29	v.I 0,001 v.II 0,001	
Grasa (IV)	5,43 ± 0,89	41	v.I 0,001 v.III 0,02	
Etanol y acetaldehido (V)	5,43 ± 1,54	41	v.I 0,001 v.II 0,001	
Acetaldehido (VI)	8,69 ± 1,54	66	v.I 0,02 v.II NS v.V 0,02	

Los resultados son media de 8 determinaciones experimentales con sus desviaciones típicas.

La t de student fué calculada comparando las parejas de resultados según se indica. Cuando este valor fué superior a 0,05 se consideró no significativo.



T A B L A   XIX

VARIACIONES EN LA ACTIVIDAD DE LA GLICEROL FOSFATO DESHIDROGENASA  
EN HIGADO DE RATA SOMETIDA A DIFERENTES TRATAMIENTOS CON ETANOL  
Y/O ACETALDEHIDO Y DIETA GRASA DURANTE TRES MESES.

Condición	Us/g hígado	%	p <	
Control (I)	1,55 ± 0,10	100		
Etanol (II)	3,20 ± 0,29	206	v.I	0,001
Etanol y grasa (III)	2,60 ± 0,55	168	v.I	0,01
			v.II	NS
Grasa (IV)	2,69 ± 0,53	174	v.I	0,01
			v.III	NS
Etanol y acetaldehido (V)	2,60 ± 0,38	168	v.I	0,001
			v.II	0,05
Acetaldehido (VI)	2,88 ± 0,55	186	v.I	0,01
			v.II	NS
			v.V	NS

Los resultados son media de 8 determinaciones experimentales con sus desviaciones típicas.

La t de student fué calculada comparando las parejas de resultados según se indica. Cuando este valor fué superior a 0,05 se consideró no significativo.



4.4.- Variaciones de las actividades enzimáticas solubles NADP dependientes: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, 6-fosfogluconato deshidrogenasa, isocitrato deshidrogenasa y enzima málico en hígado de rata sometida a diferentes tratamientos con etanol y/o acetaldehído y dieta grasa durante tres meses.

Todas las determinaciones se llevaron a cabo en la fracción soluble obtenida del sobrenadante del extracto hepático centrifugado a 105.000 g durante 45 minutos según se cita en Métodos en el apartado 3.2.3.

Los dos enzimas pertenecientes al segmento oxidativo del ciclo de los pentosa fosfatos, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa se determinaron según Glock y McLean (1953) y King (1974) respectivamente (apartados 3.2.46 y 3.2.47 de Métodos).

La actividad glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Tabla XX) resultó significativamente disminuída por efecto de etanol (79%,  $p < 0,05$ ), etanol y grasa (44%,  $p < 0,001$ ), grasa (42%  $p < 0,001$ ) y etanol + acetaldehído (63%,  $p < 0,001$ ). El acetaldehído produjo un incremento significativo frente al control (138%,  $p < 0,01$ ) y muy significativo frente al etanol ( $p < 0,001$ ).

La actividad de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa, se muestra en la Tabla XXI. En este caso el efecto del etanol y el acetaldehído no produjeron variaciones significativas y si el

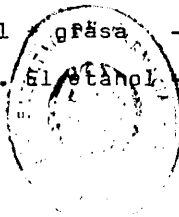
efecto de la grasa con etanol (67%,  $p < 0,01$ ) y sin etanol (57%,  $p < 0,001$ ).

El cociente de ambas actividades  $\frac{6PGDH}{G6PDH}$  aparece en la tabla XXII con resultados significativamente incrementados por efecto de la grasa (135%,  $p < 0,05$ ) y de la grasa más etanol (150%,  $p < 0,01$ ) y con resultados significativamente disminuidos por efecto del acetaldehído (75%,  $p < 0,01$ ). La diferencia de valores de este cociente entre el efecto del acetaldehído y del etanol fué también muy significativo ( $p < 0,001$ ).

La isocitrato deshidrogenasa NADP soluble se determinó por el método de Baquer y cols., (1976) según se explica en el apartado 3.2.4.8. En la tabla XXIII se muestran las actividades enzimáticas en las diferentes condiciones experimentales. La actividad isocitrato deshidrogenasa se incrementó significativamente por efecto del acetaldehído más etanol (139%,  $p < 0,05$ ) y acetaldehído (144%,  $p < 0,001$ ). La grasa y el etanol produjeron incrementos no significativos.

El enzima málico o malato deshidrogenasa descarboxilante se determinó por el método de Baquer y cols., (1976) según se explica en el apartado 3.2.4.9.

En la tabla XXIV aparecen las actividades enzimáticas en las diferentes condiciones. Los niveles de actividad se incrementaron significativamente por efecto del etanol (181%,  $p < 0,001$ ) y acetaldehído (196%,  $p < 0,001$ ). El etanol



produjo una disminución de la actividad (32%) no significativa.  
La comparación de resultados entre el acetaldehído y el etanol  
resultó altamente significativa ( $p < 0,001$ ).



T A B L A XX

VARIACIONES EN LA ACTIVIDAD DE LA GLUCOSA 6-FOSFATO DESHIDROGENASA EN HIGADO DE RATA SOMETIDA A DIFERENTES CONDICIONES DE ETANOL Y/O ACETALDEHIDO Y DIETA GRASA DURANTE TRES MESES.

Condición	Us/g hígado	%	p <
Control (I)	4,13 ± 0,44	100	
Etanol (II)	3,26 ± 0,52	79	v.I 0,05
Etanol y grasa (III)	1,84 ± 0,31	44	v.I 0,001 v.II 0,01
Grasa (IV)	1,76 ± 0,22	42	v.I 0,001 v.III NS
Etanol y acetaldehido (V)	2,61 ± 0,23	63	v.I 0,001 v.II 0,05
Acetaldehido (VI)	5,70 ± 0,65	138	v.I 0,01 v.II 0,001 v.V 0,001

Los resultados son media de 8 determinaciones experimentales con sus desviaciones típicas.

la t de student fué calculada comparando las parejas de resultados según se indica. Cuando este valor fué superior a 0,05 se consideró no significativo.

T A B L A XXI

VARIACIONES DE LA ACTIVIDAD 6-FOSFOGLUCONATO DESHIDROGENASA EN HIGADO DE RATA SOMETIDA A DIFERENTES TRATAMIENTOS CON ETANOL Y/O ACETALDEHIDO Y DIETA GRASA DURANTE TRES MESES.

Condición	Us/g hígado	%	p <	
Control (I)	8,53 ± 0,82	100		
Etanol (II)	7,28 ± 1,26	85	v.I	NS
Etanol y grasa (III)	5,70 ± 1,08	67	v.I v.II	0,01 NS
Grasa (IV)	4,89 ± 0,38	57	v.I v.III	0,001 NS
Etanol y acetaldehido (V)	6,41 ± 0,68	75	v.I v.II	0,01 NS
Acetaldehido	8,80 ± 1,36	103	v.I v.II v.V	NS NS 0,02

Los resultados son media de 8 determinaciones experimentales con sus desviaciones típicas.

La t de student fué calculada comparando las parejas de resultados según se indica, Cuando este valor fué superior a 0,05 se consideró no significativo.

T A B L A XXII

VARIACION EN EL COCIENTE 6-FOSFOGLUCONATO DESHIDROGENASA/GLUCOSA  
6-FOSFATO DESHIDROGENASA EN HIGADO DE RATA SOMETIDO A LOS DIFEREN-  
 TES TRATAMIENTOS CON ETANOL Y/O ACETALDEHIDO Y DIETA GRASA DURAN-  
 TE TRES MESES.

Condición	Us/g hígado	%	p <	
Control (I)	2,06 ± 0,28	100		
Etanol (II)	2,23 ± 0,18	108	v. I	NS
Etanol y grasa (III)	3,10 ± 0,14	150	v. I	0,01
			v. II	0,01
Grasa (IV)	2,78 ± 0,30	135	v. I	0,05
			v. III	NS
Etanol y acetaldehido (V)	2,45 ± 0,18	119	v. I	NS
			v. II	NS
Acetaldehido (VI)	1,54 ± 0,2	75	v. I	0,01
			v. II	0,001
			v. V	0,001

Los resultados son media de 8 determinaciones experimentales con sus desviaciones típicas.

La t de student fué calculada comparando las parejas de resultados según se indica. Cuando este valor resultó superior a 0,05 se consideró no significativo.

T A B L A    XXIII

VARIACIONES EN LA ACTIVIDAD DE LA ISOCITRATO DESHIDROGENASA  
NADP SOLUBLE EN HIGADO DE RATA SOMETIDA A DIFERENTES TRATAMIENTOS CON ETANOL Y/O ACETALDEHIDO Y DIETA GRASA DURANTE TRES MESES.

Condición	Us/g hígado	%	p <	
Control (I)	41,57 ± 3,25	100		
Etanol (II)	52,71 ± 11,2	127	v.I	NS
Etanol y grasa (III)	36,95 ± 3,54	89	v.I v.II	NS 0,05
Grasa (IV)	56,25 ± 4,38	135	v.I v.III	0,061 0,001
Etanol y acetaldehido (V)	57,61 ± 11,1	139	v.I v.II	0,05 NS
Acetaldehido (VI)	58,69 ± 4,40	144	v.I v.II v.V	0,001 NS NS

Los resultados son media de 8 determinaciones experimentales con sus desviaciones típicas.

La t de student fué calculada comparando las parejas de resultados según se indica. Cuando este valor fué superior a 0,05 se consideró no significativo.



T A B L A XXIV

VARIACIONES EN LA ACTIVIDAD DEL ENZIMA MALICO EN HIGADO DE RATA  
SOMETIDA A DIFERENTES TRATAMIENTOS CON ETANOL Y/O ACETALDEHIDO  
DURANTE TRES MESES.

Condición	Us/g hígado	%	p<
Control (I)	1,63 $\pm$ 0,086	100	
Etanol (II)	1,33 $\pm$ 0,27	82	v.I NS
Etanol y grasa (III)	2,95 $\pm$ 0,32	181	v.I 0,001 v.II 0,001
Grasa (IV)	1,93 $\pm$ 0,54	118	v.I NS v.III 0,02
Etanol y acetaldehido (V)	1,24 $\pm$ 0,11	76	v.I 0,001 v.II NS
Acetaldehido (VI)	3,20 $\pm$ 0,58	196	v.I 0,001 v.II 0,001 v.V 0,001

Los resultados son media de 8 determinaciones experimentales con sus desviaciones típicas.

La t de student fué calculada comparando las parejas de resultados según se indica. Cuando este valor fué superior a 0,05 se consideró no significativo.



4.5.- Variaciones en la actividad de la ATP citrato liasa malato deshidrogenasa de la fracción soluble y glutamato deshidrogenasa de la fracción mitocondrial en hígado de rata sometida a diferentes condiciones de etanol y/o acetaldehído y dieta grasa.

La ATP citrato liasa y la malato deshidrogenasa se determinan en la fracción soluble obtenida del sobrenadante del extracto hepático centrifugado a 105.000 g durante 45 minutos - según se explica en el apartado 3.2.3.

La glutamato deshidrogenasa se determinó en la fracción mitocondrial obtenida por precipitación a 12.000 g (previa eliminación de núcleos y restos celulares a 1.800 g) durante 20 minutos según se explica en el apartado 3.2.3. La solubilización de la fracción mitocondrial, suspendida en concentración 1:3, se llevó a cabo con Triton X-100 al 0,1%.

La ATP citrato liasa se determinó por el método que se explica en el apartado 3.2.4.10. Los resultados, obtenidos en las diferentes condiciones experimentales, se muestran en la Tabla XXV, donde las actividades estuvieron significativamente disminuidas en etanol (79%,  $p < 0,05$ ), etanol + grasa (70%,  $p < 0,01$ ), grasa (67%,  $p < 0,001$ ) y etanol más acetaldehído (67%,  $p < 0,01$ ). El lote con acetaldehído presentó una actividad significativamente incrementada (150%,  $p < 0,01$ ) siendo también muy significativas las diferencias entre los efectos

del acetaldehído y el etanol sobre esta actividad enzimática ( $p < 0,001$ ).

La malato deshidrogenasa citosólica se determinó según se explica detalladamente en el apartado 3.2.4.11. En la tabla - XXVI aparecen los resultados obtenidos en las diferentes condiciones de experimentación. Las actividades enzimáticas aparecen disminuidas por efecto del acetaldehído (71%,  $p < 0,01$ ) y del acetaldehído + etanol (66%,  $p < 0,001$ ). Las diferencias observadas entre el efecto del acetaldehído y el del etanol - fueron también significativas ( $p < 0,05$ ).

La glutamato deshidrogenasa NAD se determinó en la fracción mitocondrial según se explica detalladamente en el apartado 3.2.4.12. En la tabla XXVII se muestran los resultados de las actividades enzimáticas en las diferentes condiciones de experimentación. Dichas actividades estuvieron significativamente incrementadas en el caso del etanol (125%,  $p < 0,02$ ), - etanol y acetaldehído (167%,  $p < 0,001$ ) y acetaldehído )145%,  $p < 0,01$ ). La diferencia entre los efectos del etanol y acetaldehído no fué significativa.

T A B L A    XXV

VARIACIONES EN LA ACTIVIDAD DE LA ATP CITRATO LIASA EN HIGADO DE RATA SOMETIDO A DIFERENTES TRATAMIENTOS CON ETANOL Y/O ACETALDEHIDO Y DIETA GRASA DURANTE TRES MESES.

Condición	Us/g hígado	%	p <	
Control (I)	0,925' $\pm$ 0,11	100		
Etanol (II)	0,732 $\pm$ 0,10	79	v.I	0,05
Etanol y grasa (III)	0,650 $\pm$ 0,09	70	v.I v.II	0,01 NS
Grasa (IV)	0,622 $\pm$ 0,05	67	v.I v.III	0,001 NS
Etanol y acetaldehido (V)	0,622 $\pm$ 0,11	67	v.I v.II	0,01 NS
Acetaldehido (VI)	1,385 $\pm$ 0,18	150	v.I v.II v.V	0,01 0,001 0,01

Los resultados son media de 8 determinaciones experimentales con sus desviaciones típicas.

La t de student fué calculada comparando las parejas de resultados según se indica. Cuando este valor fué superior a 0,05 se consideró no significativo.



T A B L A XXVI

VARIACIONES DE LA ACTIVIDAD MALATO DESHIDROGENASA EN HIGADO DE RATA SOMETIDA A DIFERENTES TRATAMIENTOS CON ETANOL Y ACETALDEHIDO DURANTE TRES MESES

Condición	us/g. hígado	%	p <	
Control (I)	570 $\pm$ 62	100		
Etanol (II)	516 $\pm$ 65	90	v.I	N.S.
Etanol y grasa (III)	543 $\pm$ 130	95	v.I. v.II	N.S. N.S.
Grasa (IV)	587 $\pm$ 118	103	v.I v.III	N.S. N.S.
Etanol y acetaldehído (V)	374 $\pm$ 44	66	v.I v.II	0,001 0,01
Acetaldehído (VI)	407 $\pm$ 65	71	v.I v.II v.V	0,01 0,05 N.S.

Los resultados son media de 8 resultados experimentales con sus desviaciones típicas.

La t de student fué calculada comparando las parejas de resultados, según se indica. Cuando este valor fué superior a 0,05 se consideró no significativo.

T A B L A    XXVII

VARIACIONES DE LA ACTIVIDAD GLUTAMATO DESHIDROGENASA EN LA FRACCIÓN MITOCONDRIAL DE HÍGADO DE RATA SOMETIDA A DIFERENTES TRATAMIENTOS DE ETANOL Y/O ACETALDEHIDO Y DIETA GRASA DURANTE TRES MESES.

Condición	Us/g hígado	%	p <
Control (I)	11,40 ± 1,33	100	
Etanol (II)	14,27 ± 1,33	125	v.I 0,02
Etanol y grasa (III)	11,33 ± 0,37	99	v.I NS v.II 0,01
Grasa (IV)	10,76 ± 1,42	94	v.I NS v.III NS
Etanol y acetaldehido (V)	19,23 ± 1,80	167	v.I 0,001 v.II 0,01
Acetaldehido (VI)	16,40 ± 2,50	145	v.I 0,01 v.II NS v.V NS

Los resultados son media de 8 determinaciones experimentales con sus desviaciones típicas.

La t de student fué calculada comparando las parejas de valores según se indica. Cuando este valor fué superior a 0,05 se consideró no significativo.



4.6.- Variaciones de metabolitos relacionados con el estado redox citosólico y mitocondrial:  $\beta$ -hidroxibutirato, acetoacetato, malato, citrato, amonio,  $\alpha$ -cetoglutarato, glutamato y glicerol, en hígado de rata sometida a intoxicación con etanol y/o acetaldehído y dieta grasa, durante tres meses.

Las determinaciones de estos metabolitos se llevaron a cabo sobre liofilizados redisueltos de extractos hepáticos en las diferentes condiciones experimentales, obtenidos como se indica en el apartado 3.2.5.

Los niveles de  $\beta$ -OH butirato se muestran en la tabla XXVIII. El  $\beta$ -OH butirato se obtuvo según el método de Williamson y Mellamby (1974) que se explica detalladamente en el apartado 3.2.5.6. de Métodos. Los resultados obtenidos muestran incrementos muy significativos provocados por efecto del etanol (426%,  $p < 0,001$ ), etanol + grasa (257%,  $p < 0,001$ ), grasa (262%,  $p < 0,001$ ) y etanol más acetaldehído (148%,  $p < 0,02$ ). Por efecto del acetaldehído los niveles de este metabolito descendieron muy significativamente (63%,  $p < 0,001$ ). También fue muy significativa la diferencia encontrada entre los efectos del etanol y el acetaldehído ( $p < 0,001$ ).

Las concentraciones hepáticas de acetoacetato en las diferentes condiciones de experimentación se muestran en la tabla XXIX. El acetoacetato se determinó por el método de Mellamby y Williamson (1974) según se explica en el apartado 3.2.5.7 de

#### Métodos.

Los niveles de acetoacetato se incrementaron significativamente por efecto de la grasa (121%,  $p < 0,05$ ), y grasa + etanol (126%,  $p < 0,05$ ) y disminuyeron muy significativamente por efecto del acetaldehído (56%,  $p < 0,001$ ) y acetaldehído + etanol (54%,  $p < 0,001$ ). Las diferencias encontradas entre etanol y acetaldehído (II versus VI) fueron muy significativas ( $p < 0,001$ ).

Los niveles de malato se determinaron por el método de Guttman y Wahlefeld (1974) según se explica detalladamente en el apartado 3.2.5.12 de Métodos.

En la tabla XXX aparecen los resultados de las concentraciones hepáticas de malato en las diferentes condiciones de experimentación. Los valores aparecieron significativamente incrementados por efecto del etanol (168%,  $p < 0,02$ ). Las diferencias entre etanol y acetaldehído también son significativas (II versus VI) ( $p < 0,02$ ).

Las concentraciones hepáticas de citrato se determinaron por el método de Dagley (1974) según se explica detalladamente en el apartado de Métodos (3.2.5.14). Los niveles de citrato se muestran en la tabla XXXI y aparecen significativamente elevados por efecto del etanol y grasa (166%,  $p < 0,001$ ). Las diferencias entre los efectos del etanol y acetaldehído sobre las concentraciones de citrato no fueron significativas.

El amonio libre fué determinado por el método de Fonseca-Wollheim y cols. (1974) según se describe en 3.2.5.15. Los nive



las de amonio aparecen en la tabla XXXIV donde se observa un incremento significativo por efecto del etanol (135%,  $p < 0,05$ ) y etanol + grasa (127%,  $p < 0,02$ ). El lote alimentado con dieta grasa dió valores significativamente disminuídos (78%,  $p < 0,05$ ) y muy significativamente disminuídos si se compara con etanol + grasa ( $p < 0,001$ ). <sup>Las diferencias entre</sup> Los efectos del etanol y acetaldehído sobre las concentraciones de amonio (II/ VI) resultaron significativas ( $p < 0,01$ ). El 2-oxoglutarato se determinó por el método de Bergmeyer y Bernt (1974), según se indica en el apartado 3.2.5.7.

Los niveles hepáticos de 2-oxoglutarato en las diferentes condiciones experimentales se muestran en la tabla XXXII. Los resultados aparecieron significativamente disminuídos en etanol + grasa (69%,  $p < 0,01$ ), etanol y acetaldehído (65%,  $p < 0,001$ ) y - acetaldehído (55%,  $p < 0,001$ ). Las diferencias entre los efectos del etanol y los del acetaldehído (II/ VI) fueron también significativos ( $p < 0,01$ ).

El glutamato se determinó por el método de Bernt y Bergmeyer (1974) según se explica en el apartado 3.2.5.16. Los niveles de glutamato en las diferentes condiciones experimentales se muestran en la tabla XXXIII, y presentan valores significativamente disminuídos por efecto del etanol (64%,  $p < 0,02$ ), el etanol + acetaldehído (72%,  $p < 0,05$ ) y acetaldehído (54%,  $p < 0,01$ ). Las diferencias entre los efectos del etanol y el acetaldehído no fueron significativas.

El glicerol fué determinado por el método de Lagunas y Mc Lean (1970) según se explica en el apartado 3.2.5.13 de Métodos. Los niveles de este metabolito aparecieron significativamente disminuídos en etanol + grasa (71%,  $p < 0,01$ ) y no significativamente incrementados en etanol + acetatoehído (tabla XXXV).



T A B L A    XXVIII

VARIACIONES EN LOS NIVELES DE  $\beta$ -HIDROXIBUTIRATO EN HIGADO DE RATA SOMETIDA A DIFERENTES TRATAMIENTOS CON ETANOL Y ACETALDEHIDO DURANTE TRES MESES.

Condición	nmoles/g. hígado	%	p <	
Control (I)	159 $\pm$ 27	100		
Etanol (II)	677 $\pm$ 249	426	v.I	0,001
Etanol y grasa (III)	409 $\pm$ 109	257	v.I v.II	0,001 0,05
Grasa (IV)	416 $\pm$ 149	262	v.I v.III	0,001 N.S.
Etanol y acetaldehído (V)	235 $\pm$ 59	148	v.I v.II	0,02 0,001
Acetaldehído (VI)	100 $\pm$ 39	63	v.I v.II v.V	0,01 0,001 0,001

Los resultados son media de 8 determinaciones experimentales con sus desviaciones típicas.

La t de student fué calculada comparando parejas de valores según se indica. Cuando este valor fué superior a 0,05 se consideró no significativo.

T A B L A    XXIX

VARIACIONES DE LOS NIVELES DE ACETOACETATO EN HIGADO DE RATA  
SOMETIDA A DIFERENTES TRATAMIENTOS CON ETANOL Y/O ACETALDEHIDO  
Y DIETA GRASA DURANTE TRES MESES.

Condición	nmoles/g hígado	%	p <	
Control (I)	54,5 ± 12,3	100		
Etanol (II)	65,2 ± 10,1	119	v.I	NS
Etanol y grasa (III)	68,5 ± 6,7	126	v.I v.II	0,05 NS
Grasa (IV)	66,2 ± 10,8	121	v.I v.III	0,05 NS
Etanol y acetaldehido (V)	29,3 ± 7,6	54	v.I v.II	0,001 0,001
Acetaldehido (VI)	30,3 ± 11,2	56	v.I v.II v.V	0,001 0,001 NS

Los resultados son media de 8 determinaciones experimentales con sus desviaciones típicas.

La t de student fué calculada comparando las parejas de resultados según se indica. Cuando este valor fué superior a 0,05 se consideró no significativo.

T a b l a   X X X

VARIACIONES EN LOS NIVELES DE MALATO EN HIGADO DE RATA SOMETIDA A DIFERENTES TRATAMIENTOS CON ETANOL Y/O ACETALDEHIDO Y DIETA GRASA DURANTE TRES MESES.

Condición	nmoles/g hígado	%	p <	
Contról (I)	308 ± 101	100		
Etanol (II)	518 ± 169	168	v.I	0,02
Etanol y grasa (III)	358 ± 63	116	v.I v.II	NS 0,05
Grasa (IV)	351 ± 68	114	v.I v.III	NS NS
Etanol y acetaldehido (V)	369 ± 65	120	v.I v.II	NS 0,05
Acetaldehido (VI)	311 ± 53	101	v.I v.II v.V	NS 0,02 NS

Los resultados son media de 8 determinaciones experimentales con sus desviaciones típicas.

La t de student fué calculada comparando las parejas de resultados según se indica. Cuando este valor fué superior a 0,05 se consideró no significativo.

T A B L A   XXXI

VARIACIONES EN LOS NIVELES DE CITRATO EN HIGADO DE RATA SOMETIDA A DIFERENTES TRATAMIENTOS CON ETANOL Y/O ACETALDEHIDO Y DIETA GRASA DURANTE TRES MESES.

Condición	nmoles/g hígado	%	p <	
Control (I)	203 ± 25	100		
Etanol (II)	203 ± 30	100	v.I	NS
Etanol y grasa (III)	337 ± 60	166	v.I v.II	0,001 0,001
Grasa (IV)	208 ± 54	102	v.I v.III	NS 0,01
Etanol y acetaldehido (V)	161 ± 69	79	v.I v.II	NS NS
Acetaldehido (VI)	179 ± 37	88	v.I v.II v.V	NS NS NS

Los resultados son media de 8 determinaciones experimentales con sus desviaciones típicas.

La t de student fué calculada comparando las parejas de resultados según se indica. Cuando este valor fué superior a 0,05 se consideró no significativo.



T A B L A    XXXII

VARIACIONES EN LOS NIVELES DE 2-OXOGLUTARATO EN HIGADO DE RATA  
SOMETIDA A LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS CON ETANOL Y/O ACETALDE-  
HIDO Y DIETA GRASA DURANTE TRES MESES.

Condición	nmoles/g hígado	%	p <	
Control (I)	75,9 ± 19	100		
Etanol (II)	60,9 ± 13	80	v.I	NS
Etanol y grasa (III)	52,3 ± 18	69	v.I    0,01 v.II   NS	
Grasa (IV)	62,3 ± 14	82	v.I    NS v.III NS	
Etanol y acetaldehído (V)	49,4 ± 10	65	v.I    0,001 v.II   NS	
Acetaldehído (VI)	42,3 ± 7	55	v.I    0,001 v.II   0,01 v.V    NS	

Los resultados son media de 8 determinaciones experimentales con sus desviaciones típicas.

La t de student fué calculada comparando las parejas de resultados según se indica. Cuando este valor fué superior a 0,05 se consideró no significativo.



T A B L A   XXXIII

VARIACIONES DE LOS NIVELES DE GLUTAMATO EN HIGADO DE RATA SOMETIDA A DIFERENTES TRATAMIENTOS CON ETANOL Y/O ACETALDEHIDO Y DIETA GRASA DURANTE TRES MESES.

condición	nmoles/g hígado	%	p <
Control (I)	2478 ± 779	100	
Etanol (II)	1582 ± 366	64	v.I 0,02
Etanol y grasa (III)	2391 ± 392	96	v.I NS v.II 0,01
Grasa (IV)	1898 ± 350	77	v.I NS v.III 0,05
Etanol y acetaldehido (V)	1797 ± 342	72	v.I 0,05 v.II NS
Acetaldehido (VI)	1347 ± 334	54	v.I 0,01 v.II NS v.V 0,05

Los resultados son media de 8 determinaciones experimentales con sus desviaciones típicas.

La t de student fué calculada comparando las parejas de resultados según se indica. Cuando este valor fué superior a 0,05 se consideró no significativo.





T A B L A    XXXIV

VARIACIONES EN LOS NIVELES DE AMONIO LIBRE EN HIGADO DE RATA  
SOMETIDA A LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS CON ETANOL Y/O ACETALDE-  
HIDO Y DIETA GRASA DURANTE TRES MESES.

Condición	nmoles/g hígado	%	p <	
Control (I)	254 ± 33	100		
Etanol (II)	342 ± 79	135	v.I	0,05
Etanol y grasa (III)	322 ± 47	127	v.I	0,02
			v.II	NS
Grasa (IV)	196 ± 46	78	v.I	0,05
			v.III	0,001
Etanol y acetaldehído (V)	303 ± 116	120	v.I	NS
			v.II	NS
Acetaldehído (VI)	233 ± 27	92	v.I	NS
			v.II	0,01
			v.V	NS

Los resultados son media de 8 determinaciones experimentales con sus desviaciones típicas.

La t de student fué calculada comparando las parejas de resultados según se indica. Cuando este valor fué superior a 0,05 se consideró no significativo.

T A B L A   XXXV

VARIACIONES EN LOS NIVELES DE GLICEROL EN HIGADO DE RATA SOMETIDA A DIFERENTES TRATAMIENTOS CON ETANOL Y/O ACETALDEHIDO Y DIETA GRASA DURANTE TRES MESES.

Condición	nmoles/g hígado	%	p <	
Control (I)	68 $\pm$ 5,5	100		
Etanol (II)	62 $\pm$ 11	91	v.I	NS
Etanol y grasa (III)	48 $\pm$ 6	71	v.I v.II	0,01 0,05
Grasa (IV)	62 $\pm$ 14	91	v.I v.III	NS NS
Etanol y acetaldehido (V)	70 $\pm$ 6	103	v.I v.II	NS NS
Acetaldehido (VI)	68 $\pm$ 14	100	v.I v.II v.V	NS NS NS

Los resultados son media de 8 determinaciones experimentales con sus desviaciones típicas.

La t de student fué calculada comparando las parejas de resultados según se indica. Cuando este valor fué superior a 0,05 se consideró no significativo.

4.7.- Variaciones en los niveles de adenin nucleótidos en hígado de rata sometida a tratamiento con etanol y/o acetaldehído y dieta grasa, durante tres meses.

Estos metabolitos se determinaron en el extracto obtenido de disolver el liofilizado producto de la extracción ácida, - según se explica detalladamente en el capítulo de métodos - 3.2.5.

El ATP se valoró según el método de Adam (1965) modificado por Lagunas y McLean (1970) según se detalla en el apartado 3.2.5.8.

El efecto del etanol fué muy significativo sobre los niveles de ATP (53%,  $p < 0,001$ ), etanol + grasa (53%,  $p < 0,001$ ) y etanol + acetaldehído (46%,  $p < 0,001$ ). La grasa también provocó un significativo descenso (70%,  $p < 0,001$ ) y el acetaldehído (51%,  $p < 0,001$ ). Las diferencias entre el efecto del etanol y del acetaldehído sobre los niveles de ATP no fueron significativos (tabla XXXVI).

El ADP y AMP se valoraron según se explica en el apartado 3.2.5.9. El ADP no experimentó variaciones significativas en ninguno de los casos ensayados (tabla XXXVII).

Los niveles de AMP se muestran en la tabla XXXVIII y aparecen significativamente disminuídos por efecto del etanol - (72%,  $p < 0,01$ ), etanol y grasa (74%,  $p < 0,05$ ) y etanol más acetaldehído (72%,  $p < 0,01$ ).

T A B L A    XXXVI

VARIACIONES EN LOS NIVELES DE ATP EN HIGADO DE RATA SOMETIDA A LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS CON ETANOL Y/O ACETALDEHIDO Y DIETA GRASA DURANTE TRES MESES.

Condición	nmoles/g hígado	%	p <	
Control (I)	1694 + 223	100		
Etanol (II)	891 + 196	53	v.I	0,001
Etanol y grasa (III)	891 + 184	53	v.I v.II	0,001 NS
Grasa (IV)	1184 + 179	70	v.I v.III	0,001 0,01
Etanol y acetaldehido (V)	782 + 232	46	v.I v.II	0,001 NS
Acetaldehido (VI)	869 + 174	51	v.I v.II v.V	0,001 NS NS

Los resultados son media de 8 determinaciones experimentales con sus desviaciones típicas.

La t de student fue calculada comparando las parejas de resultados según se indica. Cuando este valor fue superior a 0,05 se consideró no significativo.

T A B L A    XXXVII

VARIACIONES EN LOS NIVELES DE ADP EN HIGADO DE RATA SOMETIDA A LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS CON ETANOL Y/O ACETALDEHIDO Y DIETA GRASA DURANTE TRES MESES.

Condición	nmoles/g hígado	%	p <	
Control (I)	724 ± 85	100		
Etanol (II)	688 ± 23	95	v.I	NS
Etanol y grasa (III)	684 ± 23	94	v.I v.II	NS NS
Grasa (IV)	728 ± 34	101	v.I v.III	NS NS
Etanol y acetaldehido (V)	691 ± 29	95	v.I v.II	NS NS
Acetaldehido (VI)	724 ± 22	100	v.I v.II v.V	NS 0,02 0,05

Los resultados son media de 8 determinaciones experimentales con sus desviaciones típicas.

La t de student fué calculada comparando parejas de resultados según se indica. Cuando este valor fué superior a 0,05 se consideró no significativo.



T A B L A XXXVIII

VARIACIONES EN LOS NIVELES DE AMP EN HIGADO DE RATA SOMETIDA A LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS CON ETANOL Y ACETALDEHIDO DURANTE TRES MESES.

Condición	nmoles/g. hígado	%	p <	
Control (I)	234 ± 23			
Etanol (II)	168 ± 21	72	v.I	0,01
Etanol y grasa (III)	174 ± 27	74	v.I v.II	0,05 N.S.
Grasa (IV)	257 ± 38	110	v.I v.III	N.S. 0,001
Etanol y acetaldehído (V)	168 ± 19	72	v.I v.II	0,01 N.S.
Acetaldehído (V)	210 ± 29	89	v.I v.II v.V	N.S. N.S. 0,05

Los resultados son media de 8 determinaciones experimentales con sus desviaciones típicas.

La t de student fué calculada comparando parejas de valores según se indica. Cuando este valor fué superior a 0,05 se consideró no significativo.



T A B L A    XXXIX

VARIACIONES EN LOS NIVELES DE NAD EN HIGADO DE RATA SOMETIDA  
A DIFERENTES TRATAMIENTOS CON ETANOL Y/O ACETALDEHIDO Y DIETA  
GRASA DURANTE TRES MESES.

Condición	nmoles/g hígado	%	p <	
Control (I)	513 ± 135.	100		
Etanol (II)	375 ± 70	73	v.I	0,02
Etanol y grasa (III)	429 ± 79	84	v.I v.II	NS NS
Grasa (IV)	418 ± 61	82	v.I v.III	0,05 NS
Etanol y acetaldehido (V)	326 ± 62	64	v.I v.II	0,01 NS
Acetaldehido (VI)	397 ± 117	77	v.I v.II v.V	0,05 NS NS

Los resultados son media de 8 determinaciones experimentales con sus desviaciones típicas.

La t de student fué calculada comparando las parejas de resultados según se indica. Cuando este valor fué superior a 0,05 se consideró no significativo.

T A B L A XL

VARIACIONES EN LOS NIVELES DE NADP EN HIGADO DE RATA SOMETIDA A DIFERENTES TRATAMIENTOS CON ETANOL Y/O ACETALDEHIDO DURANTE TRES MESES.

Condición	nmoles/g hígado	%	p <	
Control (I)	70 $\pm$ 11	100		
Etanol (II)	62 $\pm$ 19	88	v.I	NS
Etanol y grasa (III)	46 $\pm$ 5,5	65	v.I v.II	0,001 NS
Grasa (IV)	33 $\pm$ 9	47	v.I v.III	0,001 0,02
Etanol y acetaldehido (V)	68 $\pm$ 14	96	v.I v.II	NS NS
Acetaldehido (VI)	62 $\pm$ 16	88	v.I v.II v.V	NS NS NS

Los resultados son media de 8 determinaciones experimentales con sus desviaciones típicas.

La *t* de student fué calculada comparando las parejas de resultados según se indica. Cuando este valor fué superior a 0,05 se consideró no significativo.



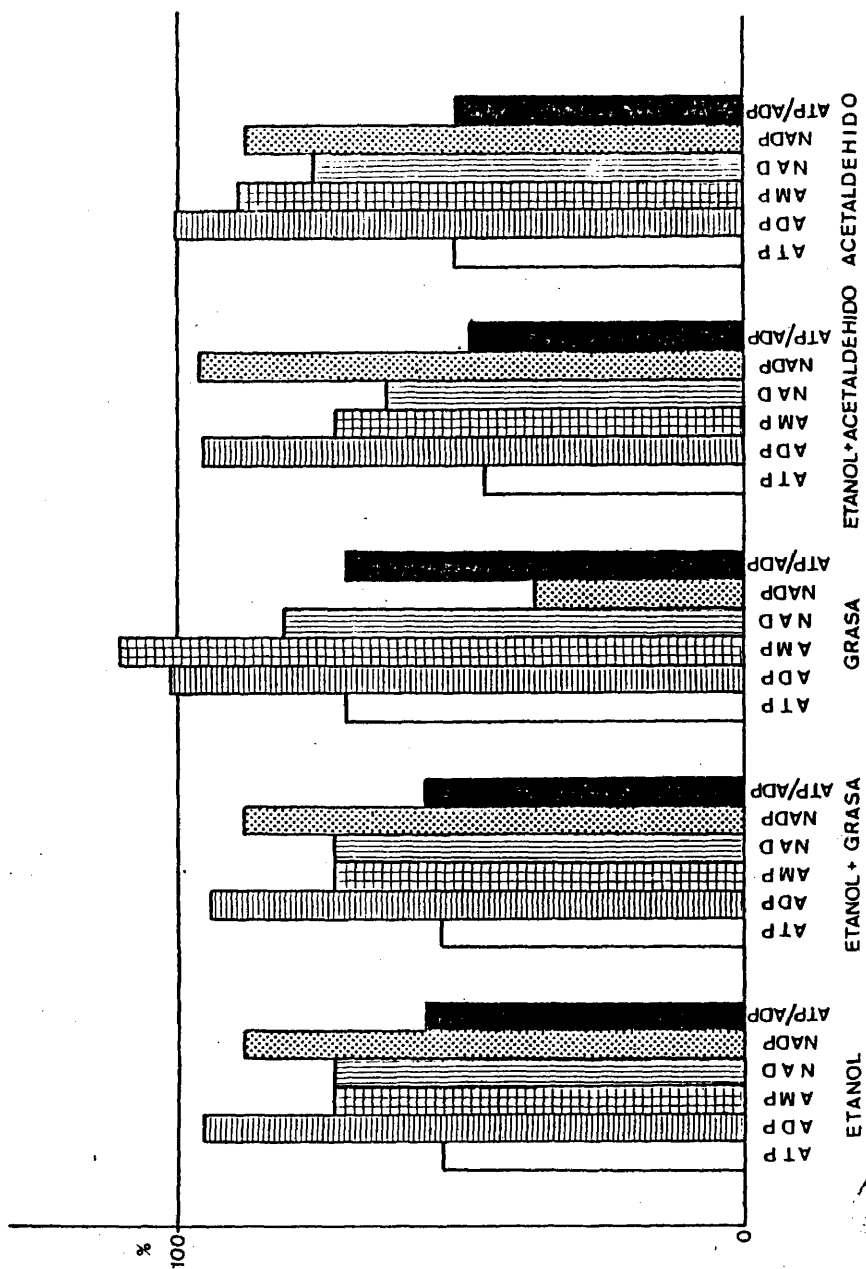


Figura 12.- Niveles de adenin nucleótidos en hígado de rata sometida a diferentes tratamientos durante tres meses. Los resultados se expresan en % frente al control.

4.8.- Variaciones en los potenciales redox citosólicos y mitocondriales en hígado de rata tratada con etanol y/o dieta grasa durante tres meses.

Los cálculos de los pares redox NAD(P)/NAD(P)H citosólicos y mitocondriales se han llevado a cabo previa determinación experimental de las parejas de metabolitos implicadas - en reacciones de óxido reducción NAD ó NADP dependientes, en el citosol o en la mitocondria y conociendo la constante de equilibrio de los enzimas correspondientes.

NAD/NADH citosólico.

Los resultados aparecen en la tabla XLI y fueron calculados mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Piruvato}}{\text{Lactato}} \times \frac{1}{K_{LDH}}$$

siendo la  $K_{LDH}$  (constante de equilibrio de la lactato deshidrogenasa)  $1,11 \times 10^{-4}$  (Williamson y cols., 1967).

El estado redox más reducido corresponde, en el citosol, al hígado tratado por efecto del etanol (27%,  $p < 0,001$ ), etanol y grasa (72%,  $p < 0,05$ ), etanol y acetaldehído (15%,  $p < 0,001$ ) y acetaldehído (48%,  $p < 0,001$ ). Las diferencias entre acetaldehído y etanol fueron muy significativas ( $p < 0,001$ ), siendo más reducido el estado citosólico NAD dependiente provocado por etanol.

#### NADP/NADPH citosólico.

Los resultados aparecen en la tabla XLI y fueron calculados mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Piruvato}}{\text{Malato}} \times \frac{\text{CO}_2}{K_{ME}}$$

siendo la concentración de  $\text{CO}_2$  en los tejidos el valor  $1,16 \times 10^{-3}$  (modificado por Veech y cols., 1969) y la constante de equilibrio del enzima'málico  $K_{ME} = 3,44 \times 10^{-2}$  (Veech y cols. 1969).

El estado redox NADP/NADPH citosólico más reducido, frente al control, correspondió al etanol + acetaldehído (24%,  $p < 0,001$ ), etanol (30%,  $p < 0,001$ ) y etanol más grasa (57%,  $p < 0,001$ ). Las diferencias entre el etanol (30%) y acetaldehído (74%) fueron muy significativas con un estado más reducido NADP dependiente en el caso del etanol.

#### NAD/NADH mitocondrial.

Los resultados aparecen en la tabla XLII y fueron calculados aplicando la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Acetoacetato}}{\beta\text{-OH butirato}} \times \frac{1}{K_{\beta\text{OHDH}}}$$

siendo la  $K_{\beta\text{OHDH}}$  (constante de equilibrio de la  $\beta$ -OH butirato deshidrogenasa)  $4.93 \times 10^{-2}$  (Williamson y cols., 1967); el estado redox mitocondrial más reducido fue para el etanol (23%,  $p < 0,001$ ), etanol y grasa (50%,  $p < 0,001$ ), grasa (48%,  $p < 0,001$ )

y etanol más acetaldehído (46%,  $p < 0,001$ ). El potencial de óxido reducción mitocondrial NAD dependiente no experimentó variaciones por efecto del acetaldehído (109%).

#### NADP/NADPH mitocondrial.

Los resultados aparecen en la tabla XLII y fueron calculados aplicando la fórmula siguiente:

$$\frac{\text{2-oxoglutarato}}{\text{glutamato}} \times \frac{\text{NH}_4^+}{1} \times \frac{1}{K_{\text{GIDH}}}$$

siendo la  $K_{\text{GIDH}}$  (constante de equilibrio de la glutamato deshidrogenasa)  $2,49 \times 10^{-3}$  (Engel y Dalziel, 1967).

El potencial de óxido reducción mitocondrial NADP dependiente resultó más oxidado por efecto del etanol con 169% ( $p < 0,01$ ). Las restantes condiciones experimentales no originaron variaciones significativas en este par.

T A B L A XLII

VARIACIONES EN EL ESTADO REDOX CITOSOLICO NAD/NADH Y NADP/NADPH EN HIGADO DE RATA SOMETIDA A DIFERENTES TRATAMIENTOS CON ETANOL Y/O ACETALDEHIDO Y DIETA GRASA DURANTE TRES MESES.

Condición	NAD/NADH *	%	p <	NADP/NADPH **	%	p <
Control (I)	1200 ± 165	100		0,0110 ± 0,002	100	
Etanol (II)	321 ± 29	27	v.I 0,001	0,0034 ± 0,0005	30	v.I 0,001
Etanol y grasa (III)	868 ± 76	72	v.I 0,05 v.II 0,001	0,0063 ± 0,0005	57	v.I 0,001 v.II 0,01
Grasa (IV)	1321 ± 198	110	v.I NS v.III 0,05	0,0076 ± 0,0011	68	v.I 0,05 v.III NS
Etanol y acetaldehido (V)	188 ± 21	15	v.I 0,001 v.II 0,001	0,0027 ± 0,0006	24	v.I 0,001 v.II NS
Acetaldehido	578 ± 39	48	v.I 0,001 v.II 0,001 v.V 0,001	0,0082 ± 0,0016	74	v.I 0,05 v.II 0,001 v.V 0,001

\*El valor NAD/NADH se calculó según la fórmula: Piruvato/Lactato × 1/K<sub>LDH</sub> (Williamson y cols., 1967).

\*\*El valor NADP/NADPH se calculó según la fórmula: Piruvato × CO<sub>2</sub>/Malato × 1/ K<sub>ME</sub> (Veech., 1969).

La t de student se consideró no significativa con valores superiores a 0,05. Cada resultado es media de 8 determinaciones experimentales con sus desviaciones típicas. Fig 13.

VARIACIONES EN EL ESTADO REDOX MITOCONDRIAL NAD/NADH Y NADP/NADPH EN HIGADO DE RATA SOMETIDA A DIFERENTES TRATAMIENTOS CON ETANOL Y/O ACETALDEHIDO Y DIETA GRASA DURANTE TRES MESES.

Condición	NAD/NADH *	%	p <	NADP/NADPH **	%	p <
Control (I)	6,69 + 0,58	100		3,13 + 0,41	100	
Etanol (II)	1,60 + 0,22	23	v.I 0,001	5,29 + 0,28	169	v.I 0,01
Etanol y grasa (III)	3,35 + 0,27	50	v.I 0,001 v.II 0,001	2,83 + 0,31	90	v.I NS v.II 0,01
Grasa (IV)	3,25 + 0,41	48	v.I 0,001 v.III NS	2,58 + 0,31	82	v.I NS v.III NS
Etanol y acetaldehido (V)	3,22 + 0,18	46	v.I 0,001 v.II 0,001	3,32 + 0,21	106	v.I NS v.II 0,01
Acetaldehido (VI)	7,30 + 0,63	109	v.I NS v.II 0,001 v.V 0,001	2,91 + 0,21	93	v.I NS v.II 0,001 v.V NS

\* El valor, NAD/NADH mitocondrial se calculó según la fórmula Acetoacetato/  $\beta$ -UHbutirato 1/K  $\beta$ -OH (Williamson y cols., 1967).

\*\* El valor NADP/NADPH se calculó en la mitocondria, según la fórmula:

2-oxoglutarato  $\times$   $\text{NH}_4^+$  / glutamato  $\times$  1/K G1DH (Engel y Dalziel, 1967).

Cada resultado es media de 8 determinaciones experimentales con sus desviaciones típicas. La t de student se consideró no significativa con valores superiores a 0,05. Figura 13.

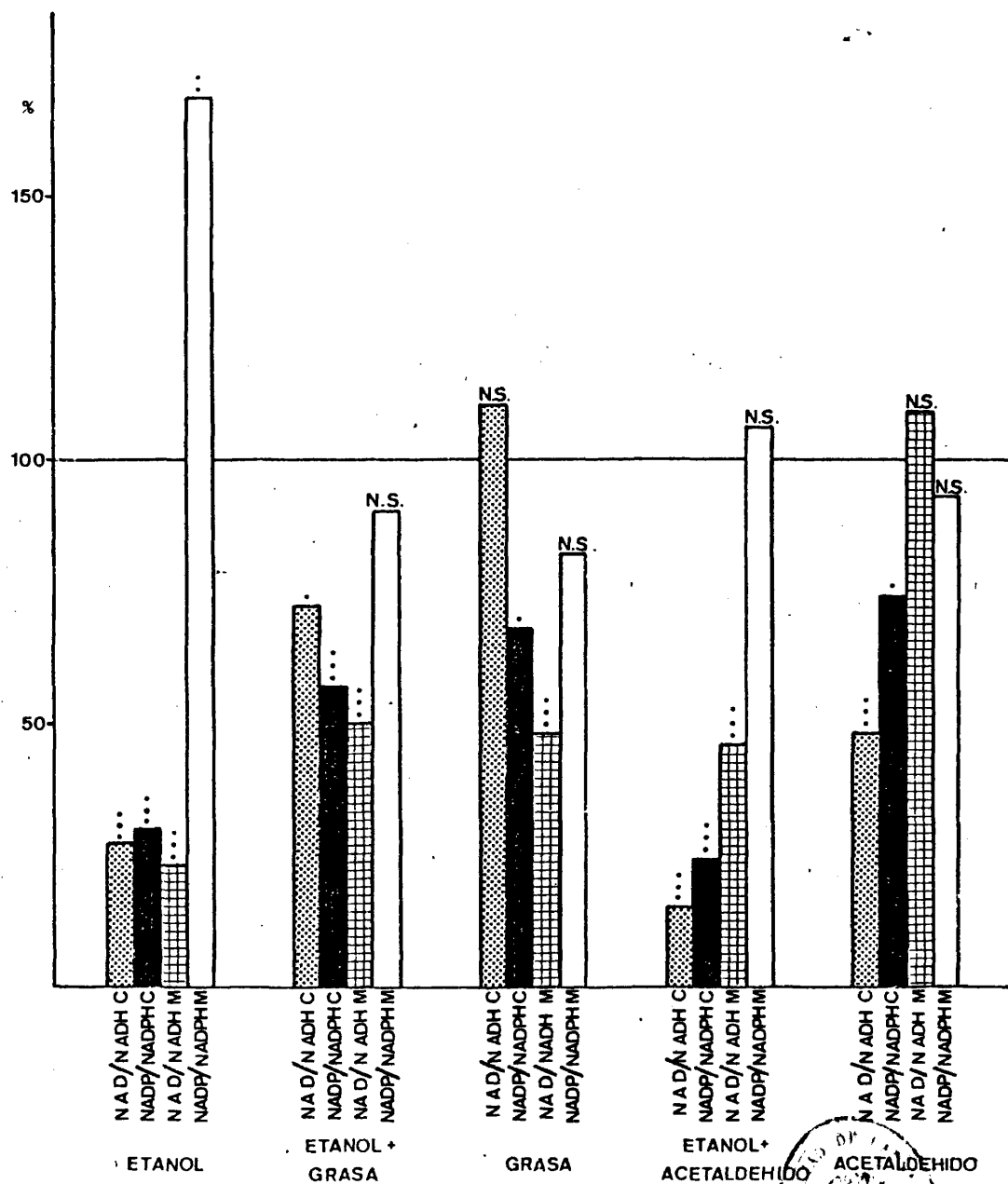


Figura 13.- Estados redox citosólico y mitocondrial en hígado de rata sometido a los diferentes tratamientos durante tres meses. Los resultados se expresan en % frente control.

5.- DISCUSSION





Se considera en general que la oxidación del etanol en hígado está limitada por la velocidad de reoxidación del NADH citosólico. En ausencia de aceptores de hidrógeno los equivalentes reductores generados en la reacción catalizada por la alcohol deshidrogenasa tienen que ser transportados a la mitocondria vía una de las lanzaderas transportadoras de hidrógeno para que reaccionen con el  $O_2$ . Considerando que el transporte de hidrógeno a la mitocondria tiene que estar regulado por el estado redox del NAD mitocondrial, no se sabe si el factor determinante de la velocidad de oxidación del etanol es la actividad de las lanzaderas o el flujo a través de la cadena transportadora de electrones (Williamson y cols., 1974).

Además de la cantidad de alcohol ingerido y de la duración de su administración, los factores nutricionales juegan un importante papel en la etiología de las enfermedades hepáticas inducidas por etanol. Aunque el doble proceso de oxidación del etanol vía acetaldehído a acetato se acepta como el responsable del desequilibrio del metabolismo hepático durante la combustión del alcohol, el papel del acetaldehído en este proceso y especialmente sobre los efectos del abuso crónico del etanol no está todavía claro. Koivula y Lindros (1975) sugieren que el acetaldehído ejerce sus mayores efectos sobre la función mitocondrial y que posiblemente la notable pérdida de actividad aldehído deshidrogenasa

mitocondrial que ellos encuentran esté en relación con los niveles incrementados de acetaldehído.

En el citosol de la célula funcional hepática tienen lugar las dos vías principales del metabolismo degradativo de la glucosa: La vía de Embden-Meyerof o glucolisis vía fructosa difosfato y la vía de los pentosa fosfatos. En la primera, la oxidación de los triosa fosfatos va a dar lugar a dos equivalentes reductores por mol de glucosa, en forma de NADH. Estos equivalentes reductores pueden acoplarse a diferentes sistemas redox citosólicos, con el objeto de regenerar el NAD para que continúe la glucolisis. Entre estos sistemas redox citosólicos el más asequible es el de reducción del oxalacetato a malato por efecto de la malato deshidrogenasa. El malato formado tiene diversas posibilidades de metabolismo: a) ser descarboxilado oxidativamente por efecto del enzima málico con formación de NADPH y piruvato; b) ser transportado como metabolito reducido al interior de la mitocondria donde se oxidará a oxalacetato por medio de la malato deshidrogenasa mitocondrial. El ciclo del malato es muy operativo en tejido adiposo y también en hígado. Parece posible postular que el mecanismo lanzadera del malato funciona alternativamente con el ciclo del malato según los requerimientos lipogénicos de la célula (figura página 69 ).

Ruta glucolítica de Embden-Meyerof y ciclo de los pentosa fosfatos.

El análisis de los perfiles de metabolitos en el estado de equilibrio y de las actividades enzimáticas en tejidos sometidos a diferentes condiciones fisiológicas producidas por variaciones nutricionales u hormonales o por la administración de tóxicos o fármacos, ha venido proporcionando en los últimos años una valiosa información sobre los enzimas que poseen una capacidad de control en las diversas rutas metabólicas de los tejidos.

Los resultados encontrados en el trabajo presente demuestran como la administración continuada de etanol y/o acetaldehído afecta notablemente el mecanismo glucolítico de Embden-Meyerof inhibiendo marcadamente los tres enzimas clave: la glucocinasa, la fosfofructocinasa y la piruvato cinasa. Sólo la aldolasa se incrementa por efecto del etanol y no por efecto del acetaldehído que la mantiene en actividad normal. Los enzimas control se identifican generalmente según dos criterios: primero, que su razón de acción de masas está lejos del equilibrio y segundo, que en casos de perturbación del sistema la concentración de su sustrato puede variar en dirección opuesta. Así el contenido en fructosa-6-fosfato del hígado está en equilibrio con el de glucosa-6-fosfato mediante la activa fosfoglucosa isomerasa y el nivel de glucosa-6-fosfato está

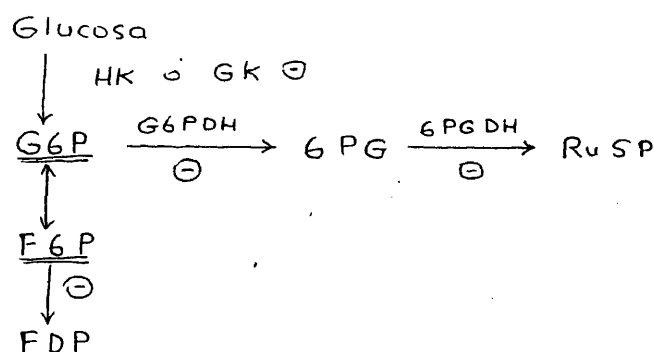
marcadamente afectado por el nivel de glucosa sanguínea y por la actividad de la glucosa ATP transferasa, especialmente la glucocinasa. Por ello el nivel de fructosa-6-fosfato es el resultado de la concentración y actividad de los dos enzimas controladores: la glucocinasa y la fosfofructocinasa.

Existen un número de metabolitos que se sabe que actúan como efectores de la fosfofructocinasa, entre ellos: AMP, ATP,  $\text{NH}_4^+$  y citrato, pero entre ellos se ha encontrado (Newsholme y Start, 1973) que el modulador más importante de la fosfofructocinasa es la concentración de fructosa-6-fosfato.

En las condiciones de experimentación, la glucocinasa apareció marcadamente disminuida por efecto del etanol (50%,  $p < 0,001$ ), grasa (40%,  $p < 0,001$ ) y acetaldehído (45%,  $p < 0,001$ ). La hexocinasa III mostró actividades significativamente bajas por efecto del etanol (47%,  $p < 0,01$ ) y no actividad por efecto del acetaldehído, mientras que la hexocinasa I incrementó por efecto del acetaldehído y la II incrementó su actividad en todos los casos.

La fosfofructocinasa disminuyó significativamente a un 75% ( $p < 0,05$ ) por efecto del etanol y a un 82% (NS) por efecto del acetaldehído. La piruvato cinasa también disminuyó a un 81% (NS) por efecto del etanol y a un 66% ( $p < 0,02$ ) por efecto del acetaldehído. Los niveles elevados de glucosa-6-fosfato y fructosa-6-fosfato se explican por la menor actividad de los enzimas del segmento oxidativo del ciclo de los pentosa fosfatos (que veremos más adelante) que son consumidores de glucosa-6-

fosfato, y por la disminuída actividad de la fosfofructocinasa.



La disminución de piruvato puede ser una consecuencia de la menor actividad de la piruvato cinasa y la menor concentración de ATP. Sobre la ruta glucolítica se observan pocas diferencias entre los efectos del etanol y acetaldehído. Sin embargo es curioso observar que sólo la aldolasa, de los enzimas glucolíticos estudiados, experimenta incremento significativo por efecto del etanol (166%,  $p < 0,001$ ) y no por efecto del acetaldehído (103%). Puede esto explicarse por un requerimiento celular de triosas ( $\alpha$ -glicerofosfato) para la biosíntesis de lípidos y para el transporte de equivalentes reductores a la mitocondria. El  $\alpha$ -glicerofosfato se encuentra en niveles elevados por efecto del etanol (379%,  $p < 0,001$ ) y del acetaldehído (215%,  $p < 0,001$ ), lo que puede indicar que existe una menor actividad en el proceso de esterificación -

de ácidos grasos libres. Este metabolito sólo se encuentra - disminuido en los casos de alimentación grasa (86%; NS).

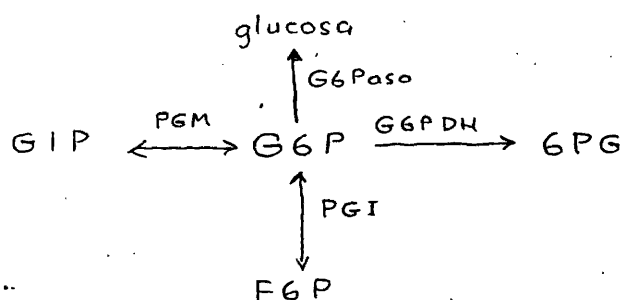
El incremento de actividad  $\alpha$ -glicerofosfato deshidrogenasa, por efecto del etanol (206%;  $p < 0,001$ ) y el acetaldehído (186%;  $p < 0,01$ ), concuerda con las concentraciones elevadas de  $\alpha$ -glicerofosfato y con el requerimiento celular de eliminar equivalentes reductores a costa de incrementar el "pool" de metabolitos reducidos, especialmente los implicados en mecanismos lanzadera.

Las concentraciones de lactato también se encuentran incrementadas a un 181% ( $p < 0,01$ ) por efecto del etanol y a un 147% ( $p < 0,001$ ) por efecto del acetaldehído. El incremento de lactato, junto con el de  $\alpha$ -glicerofosfato y malato (que veremos - después); indican un desequilibrio en el estado redox citosólico el cual frente a un exceso de equivalentes reductores - tiende a acumular metabolitos reducidos con el único propósito de regenerar coenzimas en forma oxidada.

#### Eslabón oxidativo del ciclo de los pentosa fosfatos.

Estos dos enzimas deshidrogenantes citosólicos forman junto con la isocitrato deshidrogenasa y el enzima málico el grupo de enzimas NADP dependientes que van a suministrar los equivalentes reductores en forma de NADPH para las biosíntesis citoplasmáticas especialmente la lipogenesis. Ambas enzimas aparecen inhibidos por efecto de la ingestión de etanol a 79%; -

( $p < 0,05$ ) y 85% (NS) respectivamente. El incremento de los equivalentes reducidos originados por oxidación del etanol es motivo más que suficiente para que dicha inhibición tenga lugar. La glucosa-6-fosfato se encuentra incrementada a pesar de que es un metabolito que cuenta con cuatro vías para metabolizarse



y a pesar de que la hexoquinasa III y la glucocinasa, se encuentran marcadamente inhibidas.

Si comparamos estos resultados con los también obtenidos en nuestro laboratorio en hígado de rata intoxicada con tioacetamida (Cerdan, 1978; Cerdán y cols. 1979) podemos observar cómo - existe una correlación a la inversa en los niveles de glucosa-6-fosfato y fructosa-6-fosfato y las actividades fosfofructocinasa y las deshidrogenasas del ciclo de los pentosa fosfatos.



	<u>Etanol</u>	<u>Acetaldehído</u>	<u>Tioacetamida</u>
GK	30	45	11
PFK	75	82	220
PK	81	66	36
G6PDH	79	138	171
6PGDH	85	103	146
<u>6PGDH</u> G6PDH	108	75	67
Glucosa	95	81	100
Glucosa 6 P	146	167	42
Fructosa 6 P	132	210	44

Aunque en todos los casos estudiados observamos que existe un equilibrio entre glucosa-6-fosfato y fructosa-6-fosfato, es bien notorio el incremento de ambos metabolitos por efecto del etanol y del acetaldehído y la disminución de sus niveles por efecto de la tioacetamida (Cerdán, 1978).

De los enzimas que de alguna manera pueden ser los causantes de estas variaciones, respecto al control, parece ser la fosfofructocinasa la que más influencia tiene sobre estos niveles, ya que en el caso del etanol y acetaldehído este enzima aparece disminuido en su actividad mientras que por efecto de la tioacetamida se encuentra significativamente incrementado. Otras actividades enzimáticas como la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y la glucocinasa pueden también estar implicadas en los niveles de ambas hexosas fosfato.





La actividad de la aldolasa se encuentra muy incrementada por efecto del etanol (166%,  $p < 0,001$ ) y no por efecto del acetaldehído (103%). La actividad  $\alpha$ -glicerofosfatodehidrogenasa se encuentra también incrementada tanto por efecto del etanol (206%,  $p < 0,001$ ) como del acetaldehído (186%,  $p < 0,01$ ). - Este incremento de actividades junto con el elevado nivel de  $\alpha$ -glicerofosfato (379%,  $p < 0,001$  y 215%,  $p < 0,001$ ) para etanol y acetaldehído respectivamente, se explica por el exceso de equivalentes reductores citoplasmáticos ya que la  $\alpha$ -glicerofosfato deshidrogenasa al tener su equilibrio desplazado fuertemente hacia la formación de  $\alpha$ -glicerofosfato, es una vía óptima para generar NAD.

En las figuras 1 - 10 se muestra la representación en forma de "cross over" de los metabolitos glucolíticos y los adenin nucleótidos energéticos, así como el estado redox citosólico NAD dependiente calculado según el cociente piruvato/lactato. Es curioso observar en estos esquemas "cross over" - como el estado redox citosólico  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  coincide con el cociente ATP/ADP mostrándose disminuidos en todos los casos con etanol, existiendo un desequilibrio sólo en el caso de acetaldehído versus etanol.



### Enzimas lipogénicos.

Hemos determinado enzimas directamente relacionados con la lipogénesis como son la  $\alpha$ -glicerofosfato deshidrogenasa soluble, la isocitrato deshidrogenasa, enzima málico, malato deshidrogenasa y citrato liasa.

La  $\alpha$ -glicerofosfato deshidrogenasa es un enzima ligado al mecanismo lanzadera de equivalentes reductores y por lo mismo su implicación en la intoxicación etílica es muy interesante y presenta un doble aspecto: el de transferir equivalentes reductores a la mitocondria y el proporcionar  $\alpha$ -glicerofosfato para la esterificación de ácidos grasos libres. Es sabido que la lipogénesis se inhibe cuando existe un "pool" elevado de ácidos grasos libres, pero éstos al esterificarse pueden acumularse en forma de triglicéridos dando lugar a que la lipogénesis continúe y con ello el consumo de NADPH citosólico.

Las diferencias de actividad enzimática de la  $\alpha$ -glicerofosfato deshidrogenasa, en los diferentes tratamientos, ya fueron comentadas junto con los enzimas glucolíticos, como también los niveles de  $\alpha$ -glicerofosfato, por estar tan relacionada con el equilibrio redox citosólico y con el metabolismo de las triosa fosfatos.

La isocitrato deshidrogenasa se incrementó discretamente por efecto del etanol (127%, NS) y muy significativamente por efecto del acetaldehído (144%,  $p < 0,001$ ). Aquí, el efecto inhibitor de amonio sobre la isocitrato deshidrogenasa puede muy.

bien jugar un papel que explique esta diferencia de efectos. El amonio se incrementó a 135% ( $p < 0,05$ ) por efecto del etanol y no por efecto del acetaldehído (92%, NS). Como el  $\alpha$ -cetoglutarato también disminuye; junto con el glutamato, - puede sugerirse que existe alguna otra vía del ciclo tricarboxílico también inhibida. Más tarde tratamos de los metabolitos implicados en el equilibrio redox mitocondrial, acetoacetato y  $\beta$ -OH butirato, los cuales afectan marcadamente la velocidad de flujo del ciclo tricarboxílico.

Es curioso observar la diferencia entre las actividades del enzima málico por efecto del etanol y el acetaldehído. - En el primer caso (etanol) la actividad se muestra disminuída (82%, NS) mientras que en el otro (acetaldehído) aparece significativamente incrementada (196%,  $p < 0,001$ ). Es un hecho conocido que el enzima málico incrementa su actividad en casos de hepatotoxicidad. En nuestro laboratorio se han podido - observar incrementos por encima del 200% en intoxicación con tioacetamida (Cascales y cols., 1977; Cerdán, 1978 y Cerdán y cols., 1978). Este incremento provocado por efecto de hepatotóxicos puede muy bien interpretarse como un requerimiento del sistema microsómico de oxidación de drogas o tóxicos - NADPH dependiente. Sin embargo ésta sugerencia no puede aplicarse al caso del etanol, sustancia hepatotóxica, también metabolizada por el sistema específico microsómico NADPH dependiente y cuyo efecto sobre el enzima málico es inhibidor. -

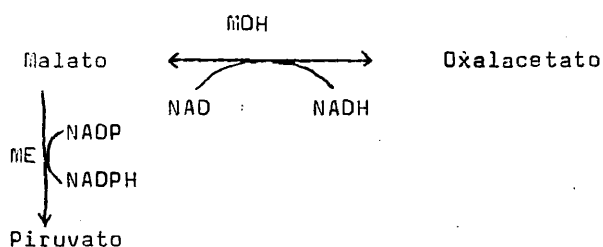
Quizás la enorme cantidad de equivalentes reductores generados en su oxidación sean más que suficientes para alimentar el sistema microsómico de oxidación del etanol y de inhibir el enzima málico, enzima que junto con la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y la 6-fosfoglutamato deshidrogenasa están también inhibidas. El acetaldehído, sin embargo, actuó de manera contraria frente a estos tres enzimas citoplasmáticos.

Entre los enzimas lipogénicos se clasifican también los dos enzimas del segmento oxidativo del ciclo de los pentosa-fosfatos, enzimas glucolíticos generadores de NADPH y enormemente controlados por el estado redox citosólico y por los niveles de acil CoA de cadena larga.

Estos dos enzimas, como ya dijimos anteriormente, se encuentran disminuídos por efecto del etanol y la dieta grasa. El acetaldehído actuó incrementando la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y manteniendo normales la actividad de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa. Los resultados del cociente de las actividades de ambos enzimas 6PGDH/G6PDH proporcionan un índice del estado lipogénico de la célula hepática (Sapag-Hagar y cols, 1973). El etanol no produjo cambios aparentes en este cociente, mientras que el etanol + dieta rica en grasa, como también la dieta grasa dieron como resultado un cociente incrementado (150% y 135%, respectivamente). Los efectos del acetaldehído disminuyendo significativamente esta relación 6PGDH/G6PDH a un 75% ( $p < 0,001$ ), hacen pensar en una lipogéne-

sis incrementada por efecto del acetaldehído, que coincide con una mayor actividad de los enzimas lipogénicos: ATP citrato - liasa (150%), enzima málico (196%) e isocitrato deshidrogenasa (144%).

Es curioso observar como el enzima málico y la malato deshidrogenasa se comportan de manera opuesta según sea el etanol o el acetaldehído el tóxico administrado, pareciendo como si de alguna manera compitieran por el malato:



Por efecto del acetaldehído el enzima málico aumenta muy significativamente (196%,  $p < 0,001$ ), mientras que la malato - deshidrogenasa disminuye a 71% ( $p < 0,01$ ). Por efecto del etanol el enzima málico disminuye (82%) y la malato deshidrogenasa - presenta una actividad del 90%. Los niveles de malato, incrementados en etanol a 168% y sin variación por efecto del acetaldehído, concuerdan con las actividades enzimáticas relacionadas.

La ATP citrato liasa está implicada en dos mecanismos lanzadera por lo menos, uno el ya citado malato-aspartato, donde

el citrato se desdobla en acetil-CoA y oxalacetato y este se reduce a malato (mediante la malato deshidrogenasa y NADH), el malato atraviesa la membrana mitocondrial como metabolito reducido. El otro sistema es el mecanismo de elongación de ácidos grasos (Lundquist, 1971) que necesita un continuo suministro de acetil-CoA para la elongación del acil-CoA. Normalmente este acetil-CoA se forma principalmente en la matriz mitocondrial y ha de ser transferido a la membrana mitocondrial extrema, donde está localizado el sistema NADH dependiente de elongación de ácidos grasos (Whereat y cols., 1969). El único sistema de importancia cuantitativa para la transferencia de acetil-CoA a través de la membrana mitocondrial interna es por medio del citrato y su desdoblamiento por medio de la citrato liasa. Durante la oxidación del etanol, el acetil-CoA puede desviar del mismo etanol y esta puede ser la causa de que se inhiba la actividad citrato liasa ya que resultados de Fellenias y cols, (1973) no encuentran que el etanol produzca efecto sobre la acetil-CoA sintetasa y sí sobre la citrato liasa. La disminución de estos dos enzimas tan implicados en los mecanismos lanzadera malato y elongación de ácidos grasos hace que se sugiera que cuando el etanol se metaboliza ninguno de estos mecanismos actúa transportando NADH a la mitocondria.

Los cambios mitocondriales en el metabolismo del citrato que se originan por ingestión crónica de etanol puede ser una

respuesta adaptativa a la acumulación de triglicéridos en la célula hepática.

En nuestros resultados la citrato liasa ATP dependiente disminuyó significativamente por efecto del etanol (79%,  $p < 0,05$ ) y aún más en el caso del etanol administrado con dieta rica en grasas (70%,  $p < 0,01$ ), resultados que coinciden a la inversa con los niveles de citrato que se encuentran más elevados por efecto del etanol y dieta lipídica (166%,  $p < 0,001$ ) y no varían por efecto del etanol. El efecto del acetaldehído frente a los niveles de citrato y de citrato liasa ATP dependiente, fué totalmente diferente al efecto del etanol. Los niveles disminuídos del citrato (88%) coinciden con la incrementada actividad de la citrato liasa, enzima dependiente del ATP que actúa sobre el citrato desdoblándolo en oxalacetato y acetil-CoA. El incremento de esta enzima por efecto del acetaldehído (150%,  $p < 0,01$ ) fué significativo.

#### Citrato liasa

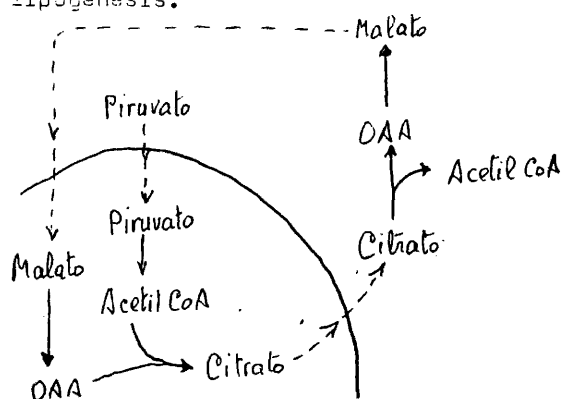
Los cambios en la actividad de la citrato liasa en animales alimentados con una dieta rica en grasa y pobre en carbohidratos son muy complejos porque son varios los factores que resultan afectados. La dieta rica en grasa llevará consigo una síntesis disminuída de ácidos grasos y una actividad disminuída de la citrato liasa (Kornacker y Lowenstein, 1965). Aunque algunos

autores han considerado que la síntesis incrementada de ácidos grasos es la fuente principal de la acumulación grasa en hígado (Lieber y Schmid, 1961; Lieber, 1967) y que esta acumulación se considera debida a la producción de NADH y acetato durante la oxidación del etanol. A partir de nuestros resultados, concernientes a la actividad disminuída de los enzimas implicados en la lipogénesis, por efecto del etanol, puede concluirse que este mecanismo no debe ser muy operativo ya que se considera - que la depresión de la lipogénesis hepática está acompañada de una reducción de la actividad del enzima málico y la citrato liasa (Tepperman y Tepperman, 1964; Kornacker y Lowenstein, 1965). Los resultados de Bode y cols., (1970) de acuerdo también con los de Fellenius y cols., (1973) sugieren que la síntesis de ácidos grasos se redujo en presencia de etanol por una inhibición de la acetil-CoA carboxilasa debida a elevadas concentraciones de ácidos grasos de cadena larga. Olivercrona y cols., (1972) han medido la síntesis de ácidos grasos "in vivo" usando agua tritiada como trazador y han observado que no existe - estimulación de la síntesis de ácidos grasos en hígado por efecto del etanol.

Al estar disminuída la glucólisis, todas las actividades - que derivan del piruvato, entre ellas el ciclo tricarboxílico, tienen que estar disminuídas, aunque no hay que olvidar que el etanol al oxidarse y convertirse en acetato puede suplir la deficiencia del piruvato y del ciclo tricarboxílico a la hora de



la lipogénesis.



#### Niveles de adenin nucleótidos.

Los niveles de ATP, ADP, AMP como también los de NAD y NADP fueron calculados en todas las condiciones experimentales. El ATP disminuyó por efecto del etanol a un 53% ( $p < 0,001$ ) y del acetaldehído (51%,  $p < 0,001$ ). El ADP no experimentó variaciones significativas tanto por efecto del etanol como del acetaldehído y el AMP disminuyó a un 72% ( $p < 0,01$ ) por efecto del etanol y a un 89% (NS) por efecto del acetaldehído. El total de estos nucleótidos resultó disminuido significativamente a un 66% por efecto del etanol y a un 68% por efecto del acetaldehído.

NAD y NADP también disminuyeron por efecto del etanol (a un 72% y 88% respectivamente) y del acetaldehído (a un 76% y 88%, respectivamente). En el caso del NADP es curioso señalar

que la mayor disminución se registró por efecto de la dieta grasa a un 37% ( $p < 0,001$ ).

El estado de fosforilación del citoplasma hepático se mide por el cociente  $ATP/ADP \times Pi$  y se altera de diferentes formas, por efecto de la ingestión de etanol, que dependen de su forma de administración (Gordon, 1977). En contraste con un incremento en este cociente, que se produce después de la administración de una sola dosis subletal de etanol (Veech, 1974) el consumo prolongado (crónico) hace que disminuya su valor por debajo de los valores normales (Bernstein y cols. 1974; Gordon, 1973). La observación de una disminución en el valor de ATP y un valor prácticamente invariable de ADP en las circunstancias de nuestros experimentos con etanol y acetaldehído indica que es la disminución de ATP hepático la causa de la disminución de este cociente. Bernstein y cols., (1974) abogan por la teoría de que la bomba de  $Na^+$  está alterada por la ingestión crónica de etanol, produciéndose una demanda de ATP que excede la capacidad celular de síntesis, mientras que otros investigadores sugieren que es la alteración de la función mitocondrial la responsable de una disminución en la síntesis de ATP (Cederbaum y cols., 1974).

Bernstein y cols. (1974) han sugerido que muchos de los cambios observados en el metabolismo hepático de animales a los que se administró etanol eran similares a los que apare-

cen en animales tratados con hormonas tiroideas. En animales tratados con tiroxina el incremento del sistema  $(Na^+ + K^+)$  - ATPasa está asociado con una disminución en el nivel de ATP y una reducción en el potencial fosfato de la célula (Edelman e Ismail-Beigi, 1974). A pesar de ello en ambos casos - tienen que estar implicados diferentes mecanismos, por ejemplo en animales tratados con tiroxina el nivel menor de ATP va asociado con un incremento de ADP, mientras que en animales tratados con etanol la disminución del nivel de ATP no - se asoció con cambios significativos en ADP. El efecto de la tiroidectomía dió unos niveles inversos en estos adenín nucleótidos (Baquer y cols., 1976).

Debe insistirse sobre el hecho de que el cociente  $ATP/ADP \times Pi$  se ha relacionado con el cociente  $NADH/NAD^+$  a través de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y la fosfoglicerato cinasa (Veech, 1974). En estas circunstancias se podría esperar que una disminución en el estado de fosforilación estuviera asociada con un incremento en el cociente  $NADH/NAD^+$ . Esto sería cierto en el caso crónico, pero en el caso agudo - (una sola dosis de etanol) ocurre lo contrario, el incremento en el estado de fosforilación coincide con una elevación del cociente  $NADH/NAD^+$ .

En el trabajo de Gordon (1977) sobre el metabolismo del - ATP en hígado graso inducido por etanol se demuestra como después de una prolongada ingestión de etanol se altera el meta-

bolismo de los acil-CoA de cadena larga. Existe una correlación directa entre el nivel incrementado de estos derivados de los ácidos grasos y la actividad del sistema adenin nucleótido translocasa y el contenido disminuído de ATP en hígado de ratas alimentadas con etanol si se considera que el nivel de ATP está en función de su velocidad de síntesis y de utilización en multitud de vías metabólicas estos resultados por nosotros obtenidos (disminución de ATP a un 53%) sólo pueden reflejar una pequeña parte de un problema muy complejo. Nuestros resultados sugieren que los cambios en el metabolismo lipídico producido por el consumo de etanol puede alterar la translocación del ADP (Gordon, 1977) al interés de la membrana mitocondrial y esto limitaría el proceso de fosforilación oxidativa. Por tanto el disminuído potencial de fosfato del citoplasma podría explicarse por cambios en la velocidad de síntesis del ATP.

### Metabolitos relacionados con el estado redox mitocondrial.

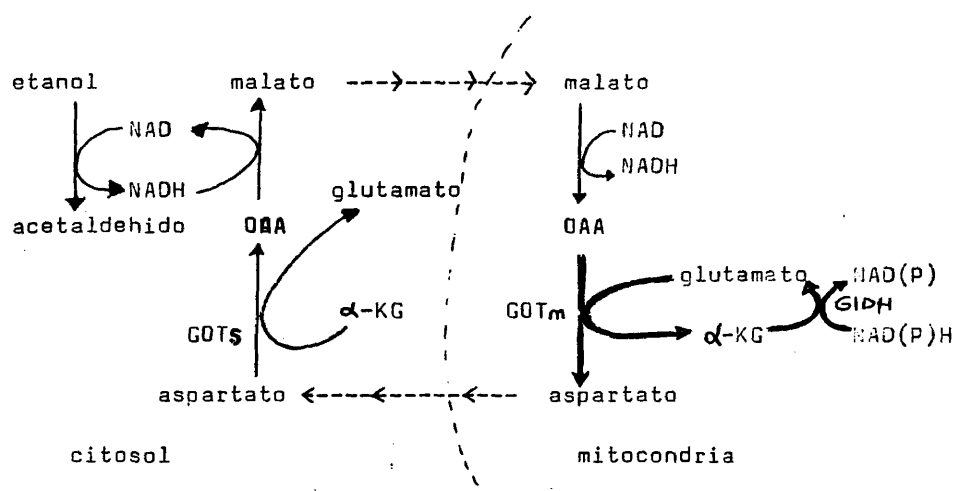
La interferencia de la mitocondria con el metabolismo del etanol es muy importante ya que el 80% de la aldehído deshidrogenasa se encuentra en la mitocondria (Marjanen, 1972) y porque en la mitocondria se reoxida el exceso de NADH que procede de la oxidación de metabolitos reducidos, transportados al interior de la mitocondria vía mecanismos lanzadera. Estos metabolitos son principalmente el malato y el  $\alpha$ -glicerofosfato.

Los principales efectos provocados por efecto del etanol en la mitocondria han sido un desequilibrio en determinadas actividades enzimáticas, una inhibición de la síntesis proteica mitocondrial, un incremento en la  $\alpha$ -glicerofosfato deshidrogenasa (Kieessling, 1968) y una disminución en el transporte de ADP a la mitocondria debido posiblemente al incremento de acil-CoA de cadena larga (Gordon, 1973 y 1977). A pesar de estas observaciones no han podido detectarse cambios en la permeabilidad mitocondrial frente a los principales metabolitos de las lanzaderas (Cederbaum, 1978).

En el mecanismo lanzadera del malato está implicada la aminotransferasa del aspartato. El malato originado por reducción de la malato deshidrogenasa citosólica, penetra en la mitocondria donde se oxida a oxalacetato por acción de la malato deshidrogenasa mitocondrial. Como el oxalacetato no puede atravesar la membrana mitocondrial, se requieren dos reaccio-



nes de aminotransferancia con el objeto de recuperar el oxalacetato citosólico:



Como el glutamato procede del 2-oxoglutarato por acción de la glutamato deshidrogenasa mitocondrial que se encuentra significativamente incrementada por efecto del etanol (125%,  $p < 0,02$ ) y del acetaldehído (145%,  $p < 0,01$ ) y como la actividad de la aminotransferasa del aspartato mitocondrial se encuentra también incrementada (Cascales y cols., 1979), esto puede explicar el bajo nivel de glutamato encontrado por nosotros por efecto del etanol (64%,  $p < 0,02$ ) y del acetaldehído (54%,  $p < 0,01$ ) como también el estado del par redox NADP/NADPH mitocondrial que aparece significativamente más oxidado (169%) por efecto del etanol.

El nivel disminuído de ATP que hemos encontrado y el nivel incrementado de equivalentes reductores NAD mitocondriales son

una prueba de que la cadena respiratoria transportadora de electrones no trabaja lo suficientemente rápido como para oxidar los equivalentes reducidos transportados a la mitocondria. Por ello el acoplamiento de la glutamato deshidrogenasa (regeneradora de NAD(P)) y de la aminotransferasa del aspartato, proporcionan un mecanismo que al acoplarse con la malato deshidrogenasa en el sentido de formación de oxalacetato y NADH equilibra su estado redox sin necesidad de recurrir a la cadena respiratoria. También podría el oxalacetato salir de la mitocondria utilizando la vía del citrato, pero el ciclo tricarboxílico aparece inhibido, como también los niveles de piruvato y consecuentemente los de acetil-CoA, especialmente en el caso del etanol.

Un fuerte incremento del  $\beta$ -OH butirato mitocondrial (42%,  $p < 0,001$ ) producido por efecto del etanol y por efecto de la dieta rica en grasa (262%,  $p < 0,001$ ) contrarresta con la significativa disminución de este metabolito por efecto del acetaldehído (63%,  $p < 0,01$  versus control, y  $p < 0,001$  versus etanol). El cociente  $\beta$ -OH butirato/acetoacetato se triplica por efecto del etanol y presenta valores muy semejantes a los normales por efecto del acetaldehído. Esto está de acuerdo con las observaciones de Cederbaum y cols., (1974) quienes concluyen que no es el mecanismo lanzadera el que se afecta principalmente por efecto del etanol, sino más bien los sistemas mi



tocondriales de generación de NAD. El efecto del acetaldehído sobre el cociente ( $\beta$ -OH butirato/acetoacetato (cercano a la normalidad) puede también explicarse por la pequeña dosis a que fué suministrado.

El lugar principal de inhibición de la velocidad del ciclo tricarboxílico en hepatocitos aislados (Ontko, 1974) se ha visto que es a nivel de la oxidación del 2-oxoglutarato. El efecto inhibitor se lleva a cabo por el  $\beta$ -OH butirato y se contrarresta por acción del acetoacetato. La oxidación del etanol se transmite al lugar de oxidación del 2-oxoglutarato por medio del estado redox NAD dependiente. Los resultados de Ontko (1974) indican que el efecto principal del etanol y el  $\beta$ -OH butirato sobre la oxidación del 2-oxoglutarato es la inhibición de la 2-oxoglutarato deshidrogenasa por exceso de NADH. Sin embargo la aminación reductora catalizada por la glutamato deshidrogenasa del 2-oxoglutarato se estimula a un 125% y 145% para el etanol y acetaldehído, respectivamente. Como el efecto inhibitor del etanol sobre el flujo del ciclo tricarboxílico está mediado por el incremento del NADH mitocondrial cualquier agente que eliminase este exceso de equivalentes reductores eliminaría tal inhibición. Se ha visto que el acetoacetato contrarresta los efectos inhibidores del etanol sobre la oxidación del palmitato, citrato, 2-oxoglutarato y glutamato (Ontko, 1974).



Pares redox NAD(P)/NAD(P)H citosólicos y mitocondriales.

La importancia reguladora de los pares redox NAD(P)/NAD(P)H citosólicos y mitocondriales ha sido ya ampliamente descrita especialmente en casos de intoxicación etílica donde el doble proceso oxidativo del etanol origina un incremento de equivalentes reductores.

El par NADP/NADPH mitocondrial, calculado a través del equilibrio de la glutamato deshidrogenasa, aparece significativamente más oxidado (169%,  $p < 0,01$ ) en hígado de rata tratada con etanol. Este resultado va acompañado por el valor más reducido que presenta el par NAD/NADH mitocondrial, calculado mediante el equilibrio de la  $\beta$ -OH butirato deshidrogenasa, también por efecto del etanol (23%,  $p < 0,001$ ). El efecto del acetaldehído sobre los pares redox mitocondriales fué bien distinto al del etanol. NADP/NADPH presentó valores cercanos al control (93%) y también el par NAD/NADH (109%). La dieta rica en grasa administrada a ratas produjo un incremento en los equivalentes reductores NAD mitocondriales con un cociente del par NAD/NADH del 43% ( $p < 0,001$ ). El par NADP/NADPH mitocondrial disminuyó al 82% no significativamente.

El par NADP/NADPH citosólico, calculado a través del equilibrio del enzima málico, muestra un desplazamiento hacia un estado más reducido por efecto del etanol (30%,  $p < 0,001$ ) y del acetaldehído (74%,  $p < 0,05$ ). Esta situación no

favorece el funcionamiento de los enzimas lipogénicos, especialmente en el caso del etanol, donde estos enzimas resultan marcadamente inhibidos cuando los cocientes NADP/NADPH son muy bajos. La dieta rica en grasa inclinó el cociente NADP/NADPH citosólico hacia un estado más reducido (68%,  $p < 0,05$ ).

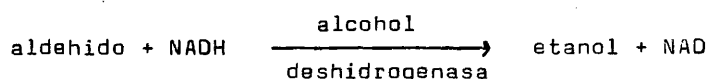
Existen al menos tres vías metabólicas que pueden incrementar la relación NADP/NADPH citosólica: aumento de la lipogénesis, incremento del sistema monooxigenasa microsómico y aumento de la transferencia de equivalentes reductores del citosol a la mitocondria. La actividad disminuída de los enzimas del segmento oxidativo del ciclo de los pentosa fosfatos, así como del enzima málico, por efecto del etanol, demuestran que la lipogénesis en este caso, no sólo no se incrementa, sino que aparece disminuída. Estas conclusiones concuerdan con las sugerencias de Fellenius y cols., (1973). Sin embargo en el caso del acetaldehído, aunque este cociente NADP/NADPH citosólico presente un valor menor que el control, la diferencia no es tan grande como en el caso del etanol. La actividad de los enzimas del segmento oxidativo del ciclo de los pentosa fosfatos aparecen incrementadas y el enzima málico incrementó su actividad. Por todo ello llegamos a sugerir que el acetaldehído produjo, en las condiciones de nuestra experimentación, un discreto incremento en la lipogénesis.

La pareja NAD/NADH citosólica, calculada a través de la lactato deshidrogenasa, aparece significativamente más reducida en el caso del etanol (27%,  $p < 0,001$ ) y del acetaldehído (48%,  $p < 0,001$ ). Es difícil explicar el efecto del acetaldehído sobre los sistemas celulares de óxido reducción. Mientras que los dos sistemas NAD/NADH y NADP/NADPH están significativamente disminuidos en el compartimento citosólico, en la mitocondria estos dos sistemas permanecen prácticamente inalterados presentando, sin embargo, diferencias muy significativas frente al etanol. Puede sugerirse que, en el caso del acetaldehído, la translocación de los equivalentes reductores se encuentre inhibida. La alimentación rica en grasa no produjo cambios significativos en el cociente redox NAD citosólico.

El hecho de que por efecto del etanol el par NAD/NADH se encuentre más reducido tanto en el compartimento citosólico (27%) como en el mitocondrial (23%), indica que el mecanismo lanzadera funciona normalmente y se establece un equilibrio entre los estados redox de ambos compartimentos. Este equilibrio se encuentra muy desplazado hacia un estado muy reducido debido probablemente a que los equivalentes reductores entran en la mitocondria más rápidamente de lo que ellos pueden ser reducidos. En el caso del par NADP/NADPH no ocurre lo mismo - ya que por efecto del etanol este cociente está muy reducido en el citosol (30%) y más oxidado en la mitocondria (169%).

Posiblemente la inhibición de la lipogénesis juegue un importante papel en este fenómeno, como también la menor oxidación mitocondrial de las cadenas de acil-CoA.

El efecto del acetaldehído sobre el par NAD/NADH en el citosol (48%) y en la mitocondria (109%), hace pensar en que los mecanismos lanzadera no funcionan correctamente mientras que los mecanismos mitocondriales de regeneración del NAD mitocondrial no parece que estén afectados. Aquí convendría sugerir, que si bien está demostrado (Parrilla, 1974) que el acetaldehído se oxida mayoritariamente en la mitocondria, pudiera ser que una gran parte de él (especialmente si, como en nuestro caso, se administra como único tóxico) al encontrarse en el compartimento citosólico, en presencia de alcohol deshidrogenasa, pH neutro y exceso de NADH, se convirtiese en etanol, ya que en estas condiciones son favorables para que la reacción de la alcohol deshidrogenasa se incline hacia este sentido.



Sobre el par NADP/NAOPH el acetaldehído produce una reducción en el citosol (74%) y no en la mitocondrial (93%), lo que refuerza el hecho de que el discreto incremento en la lipogénesis producido por efecto del acetaldehído puede actuar equilibrando los estados redox de los compartimentos citosó-

## 6.- C O N C L U S I O N E S

## 6.- RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se ha estudiado el efecto de la administración oral de etanol y/o acetaldehído y dieta grasa, durante tres meses, sobre el metabolismo glucolítico y lipogénico en hígado de rata.

El etanol administrado al 20% (4M) en el agua de bebida, originó una pérdida de actividad en los enzimas glucolíticos clave: glucocinasa, fosfofructocinasa y piruvato cinasa, y en los enzimas del segmento oxidativo del ciclo de los pentosa fosfatos: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa.

El acetaldehído administrado al 0.2% (aproximadamente 0,4 mM) produjo efectos similares en los enzimas glucolíticos (glucolisis vía fructosa difosfato), pero sobre la actividad de los enzimas del ciclo de los pentosa fosfatos, el efecto fué contrario, apareciendo valores superiores al control. El cociente entre las actividades de las dos enzimas oxidativos de dicho ciclo dió valores inferiores al control, mostrando por ello, una situación de lipogénesis incrementada, que no aparece por efecto del etanol.

La situación lipogénica disminuída, por efecto del etanol, e incrementada, por acción del acetaldehído, se comprueba mediante el estudio de las actividades enzimáticas de dos enzimas lipogénicos: la citrato liasa ATP dependiente, y el enzima málico. Ambos enzimas aparecen con una actividad disminuída por efecto del etanol y aumentada por el del acetaldehído. Los niveles de metabolitos relacionados con estas actividades, como son el citra-

to y el malato, refuerzan estos resultados.

Este incremento lipogénico observado por efecto del acetaldehído, puede ser un mecanismo de defensa de la célula para disminuir el exceso de equivalentes reductores que tienen que surgir en la oxidación del acetaldehído a acetato. El efecto contrario del etanol disminuyendo la lipogénesis puede ser debido a que las elevadas concentraciones de administración de este tóxico actúan a nivel intestinal impidiendo la absorción de aminoácidos tales como la metionina - intimamente implicados en la movilización de lípidos en hígado - y originando un acúmulo de lípidos que sea el responsable principal de la inhibición de la lipogénesis.

El estado redox del compartimento citosólico es el que resulta más afectado, hacia un estado más reducido, por efecto del acetaldehído, tanto en el caso del par NAD dependiente como en el del NADP. Es curioso observar, sin embargo, como el estado redox mitocondrial permaneció con valores muy cercanos al control.

Los niveles de adenín nucleótidos ATP, ADP y AMP guardan una relación muy similar tanto por efecto del etanol como del acetaldehído, mostrando en ambos casos de intoxicación, unos niveles muy disminuídos de ATP, lo cual demuestra que existe bien una deficiencia en la translocación de ADP a la mitocondria, o una deficiencia en el mecanismo mitocondrial oxidativo de generación de ATP.

- 1<sup>a</sup>. - El incremento de peso en los tres meses de tratamiento experimentó variaciones muy significativas ( $p < 0,001$ ) en todas las condiciones ensayadas. De menor a mayor es: etanol + grasa, 52%; etanol + acetaldehído, 64%; acetaldehído, 72% y etanol, 90%.
- 2<sup>a</sup>. - La relación peso hígado/peso cuerpo - que marca el grado de hipertrofia hepática - experimentó cambios poco notables: etanol, 110% ( $p < 0,05$ ); etanol + grasa, 139% ( $p < 0,001$ ); grasa, 113% ( $p < 0,01$ ). El acetaldehído no produjo variación apreciable.
- 3<sup>a</sup>. - Los niveles de proteínas solubles citosólicas solamente varían significativamente en el caso de etanol + grasa con un 73%.
- 4<sup>a</sup>. - Los niveles de proteínas mitocondriales experimentaron alteraciones poco relevantes por efecto del acetaldehído (87%).
- 5<sup>a</sup>. - Los enzimas clave de la glucólisis - glucocinasa, fosfofructocinasa y piruvato cinasa - disminuyen por efecto del etanol al 30%, 75% y 81% respectivamente, y por acción del acetaldehído al 45%, 75% y 66% respectivamente.
- 6<sup>a</sup>. - La aldolasa muestra actividad incrementada por efecto del etanol (166%) y no por el del acetaldehído (103%).
- 7<sup>a</sup>. - La  $\alpha$ -glicerofosfato deshidrogenasa de la fracción soluble se eleva claramente por efecto del etanol (206%) y del acetaldehído (186%). Las cifras de  $\alpha$ -glicerofosfato son muy altas por efecto del etanol (379%) y del acetaldehído (215%).



- 8<sup>a</sup>.- Los enzimas del segmento oxidativo del ciclo de los pentosa fosfatos pierden su actividad por efecto del etanol a un 79% y un 85% respectivamente, mientras que por el del acetaldehído suben a un 138% y 103% respectivamente. El cociente de estas dos actividades 6PGDH/G6PDH experimenta un discreto incremento por efecto del etanol y una evidente disminución por efecto del acetaldehído (75%). Esto indica que no existe mayor lipogénesis por efecto del etanol y si por el del acetaldehído.
- 9<sup>a</sup>.- La inhibición de las actividades del enzima málico (82%) y de la citrato liasa (79%), por acción del etanol refuerzan la idea de que no colabora este tóxico a una hiperlipogénesis.
- 10<sup>a</sup>.- El aumento de las mismas actividades por efecto del acetaldehído a 196% y 150% respectivamente, señalan una situación más lipogénica, lo que corrobora los resultados de la conclusión 8<sup>a</sup>.
- 11<sup>a</sup>.- El etanol disminuye significativamente los valores de ATP (53%), también los de AMP (72%) y mantiene casi en su normalidad los de ADP (95%). El total de estos adenín nucleótidos baja a un 66%. El acetaldehído origina consecuencias similares.
- 12<sup>a</sup>.- Los niveles de citrato guardan una relación inversa con la actividad de la citrato liasa. En el caso del etanol el citrato no cambia frente al control (100%), pero en el del acetaldehído disminuye a un 88%.

- 13a.- Los niveles de malato suben netamente (153%) por efecto del etanol; no ocurre así con la malato deshidrogenasa citosólica (90%) y con el enzima málico que disminuyen. Por acción del acetaldehído el malato permanece en niveles semejantes al control (101%), la malato deshidrogenasa baja a un 71% y en enzima málico se eleva.
- 14a.- Los valores de amonio libre son superiores por efecto del etanol (135%), lo que sería debido a una menor funcionalidad del ciclo de la urea. La mayor actividad de la glutamato deshidrogenasa mitocondrial (125%) es una prueba de la tendencia de la célula hepática a disminuir el ión amonio y los equivalentes reductores.
- 15a.- La acción del acetaldehído sobre las cifras de ión amonio es inversa a la del etanol y se registran niveles del 92%. En cambio la actividad glutamato deshidrogenasa se eleva claramente (145%).
- 16a.- Entre los metabolitos reducidos de la célula hepática, es el glutamato el único que no se incrementa, tanto por efecto del etanol (64%) como del acetaldehído (54%).
- 17a.- El estado del par redox NAD/NADH citosólico, calculado por los niveles de piruvato y lactato, y la constante de equilibrio de la lactato deshidrogenasa, desciende a un 27% por efecto del etanol y a un 48% por el del acetaldehído. El exceso de equivalentes reductores NAD citosólicos por efecto del etanol es casi dos veces superior al provocado por el acetaldehído, siendo la concentración administrada 100 veces superior del primero que la del segundo.

- 18<sup>a</sup>. - El estado del par redox NADP/NADPH citosólico, calculado según los niveles de malato, piruvato y  $\text{CO}_2$  y la constante de equilibrio del enzima málico, baja a un 30% por efecto del etanol y a un 74% por el del acetaldehído. En este caso el exceso de equivalentes reductores provocado por el etanol es 2,5 veces superior al del acetaldehído.
- 19<sup>a</sup>. - El estado del par redox NAD/NADH mitocondrial, calculado según los niveles de  $\beta$ -hidroxibutirato y acetoacetato, y la constante de equilibrio de la  $\beta$ -hidroxibutirato deshidrogenasa, disminuye a un 23% por efecto del etanol, no experimentando variaciones por el del acetaldehído (109%).
- 20<sup>a</sup>. - El estado del par redox NADP/NADPH mitocondrial, calculado según los niveles de glutamato, 2-oxoglutarato y amonio libre y la constante de equilibrio de la glutamato deshidrogenasa, se incrementó a un 169% por efecto del etanol y no experimentó variaciones sensibles por el del acetaldehído.
- 21<sup>a</sup>. - El etanol, unido a una dieta rica en lípidos, origina un desequilibrio hepático considerable en la glucólisis, reflejado en la muy característica caída de los enzimas siguientes: glucocinasa, 30%; fosfofructocinasa, 63%; piruvatocinasa, 29%; glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, 44%; y 6-fosfogluconato deshidrogenasa 67%. El aumento del cociente 6PGDH/G6PDH a un 150% indica una situación lipogénica disminuída. La citrato liasa desciende al 70% y el enzima málico se eleva al 181%. Los iones citrato y amonio ascienden sus cotas a 166%

y 127; respectivamente. El glutamato no varía como tampoco la glutamato deshidrogenasa.

El estado redox citosólico se reduce marcadamente en el par NADP/NADPH con un 57%, mientras que en el mitocondrial, el exceso de equivalentes reductores se debe al par NAD/NADH con un 50%.

22ª.- El etanol unido al acetaldehído ( en proporciones aproximadas a las que se encuentra en un vino de crianza) origina un marcado descenso en las actividades enzimáticas siguientes: glucocinasa, 11%; fosfofructocinasa, 61%; y piruvato-cinasa 41%. Los niveles de ATP (46%), piruvato (30%) y citrato (79%), se encuentran tambien muy disminuídos.

El estado redox citosólico NAD es el más reducido de todos los ensayados, con un 15% y asimismo, el correspondiente al par NADP/NADPH citosólico con un 24%. En el compartimento mitocondrial el estado redox muestra valores muy bajos para el par NAD/NADH (46%), no así para el NADP/NADPH que está cercano a la media normal.

23ª.- Se concluye: que los efectos del acetaldehído, en concentraciones diez veces menores que el etanol, provoca un desequilibrío metabólico a todos los niveles. Actúa frente a la lipogénesis de manera opuesta al etanol y de forma similar, en cuanto al metabolismo glucolítico y energético.



7.- BIBLIOGRAFIA

### BIBLIOGRAFIA

- Adam, H. (1965) en *Methods of Enzymatic Analysis* (ed. Bergmeyer, H.U.) pp. 573-577. Verlag Chemie.
- Ballard, F.J. y Hanson, R.W. (1967) *Biochem. J.* 102: 952.
- Bañuelos, M., Gancedo, C. y Gancedo, J.M. (1977) *J. Biol. Chem.* 252: 6394-6398.
- Baquer, N.Z., Cascales, M., Teo, B.C. y McLean, P. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 52: 263-269.
- Baquer, N.Z., Cascales, M., McLean, P. y Greenbaum, A.L. (1976) *Eur. J. Biochem.* 68: 403-413.
- Barzu, O. (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* 182: 42-51.
- Beitner, R., Haberman, S. y Cycowitz, T. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 482: 330-340.
- Berglund, L., Ljungstrom, O. y Engstrom, L. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 6108.
- Bergmeyer, H.U. y Bernt, E. (1974) en *Methoden der Enzymatischen Analyse* (ed. Bergmeyer, H.U.) pp. 1624-1627. Verlag Chemie.
- Bergmeyer, H.U., Gawohn, K. y Grassl, M. (1974) en *Methoden der Enzymatischen Analyse*. (ed. Bergmeyer, H.U.) pp. 454-558, Verlag Chemie.
- Bernstein, J., Videla, L. e Israel, Y. (1974) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 242:560.
- Bernt, E. y Bergmeyer, H.U. (1974) en *Methoden der Enzymatischen Analyse*. (ed. Bergmeyer, H.U.) 1749-1753.
- Berry, M.N., Kun, E. y Werner, H.V. (1973) *Eur. J. Biochem.* 33: 407-417.
- Blair, J.B., Cimbala, M.A., Foster, J.L. y Morgan, R.A. (1976) *J. Biol. Chem.* 251: 3756-3762.
- Bloxham, D.P. y Lardy, H.A. (1973) en *The Enzymes* (ed. Boyer, P.D.) 8A, 238-278. Academic Press.
- Bode, Ch., Stähler, E., Kono, H. y Goebell, H. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 210: 448.
- Brand, I.A. y Söling, H.D. (1974) *J. Biol. Chem.* 249: 7824.
- Brand, I.A., Müller, M.K., Unger, C. y Söling, H.D. (1976) *FEBS Letters* 68: 271-274.

- y Wojtczak, A.B.
- Bremen, J. (1972) Biochim. Biophys. Acta 280: 515.
  - Bressler, R. (1970) Comprehensive Biochemistry 18: 331-359.
  - Brock, D.J.H. (1969) Biochem. J. 113:235-242.
  - Brodie, A.F. y Lippmann, F. (1955) J. Biol. Chem. 212: 677.
  - Bücher, Th. (1947) Biochim. Biophys. Acta, 1, 292.
  - Bücher, Th. y Klingenberg, M. (1958) Angew. Chem. 70, 552.
  - Bücher, Th. y Sies, H. (1976) en Metabolic studies (ed. <sup>1976</sup> V.S. Ling y Williamson) pp. 41-64. North Holland Pub. Co. Amsterdam.
  - Burns, E. y Bergmeyer, H.U. en Methods in Enzymatic Analysis (ed. Bergmeyer, H.U.) (1965).
  - Cahill, G.F., Ashmore, J., Earl, A.S. y Zottu, S. (1958a) Amer. J. Physiol. 192: 91.
  - Cahill, G.F., Hastings, A.B., Ashmore, J. y Zottu, S. (1958b) J. Biol. Chem. 230: 125-135.
  - Carbonell, J., Feliú, J.E., Marco, R. y Sols, A. (1973) Ekr. J. Biochem. 37: 148-156.
  - Cascales, M., Feijóo, B., Cerdán, S., Robles-Chillida, E.M. y Santos-Ruiz, A. (1977) Ann. Pharm. Franç. 35: 447-459.
  - Cascales, C., Cascales, M., Santos-Ruiz, R., Cerdán, S., y Santos-Ruiz, A. (1979a) Presentado al VII Congreso SEB Murcia.
  - Cascales, M., Cerdán, S., Santos-Ruiz, R., Feijóo, B. y Santos-Ruiz, A. (1979b) Arch. Toxicol. Suppl. 2: 497.
  - Cascales, M., Feijóo, B., Cerdán, S., Cascales, C. y Santos-Ruiz, A. (1979c) J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 17: 129-132.
  - Cederbaum, A., Lieber, C.S. y Rubin, E. (1974) Arch. Biochem. Biophys. 165: 560.
  - Cederbaum, A.I., Dicker, E., Lieber, C.S. y Rubin, E. (1973) Biochem Pharmacol. 27: 7-15.
  - Cerdán, S. (1978) Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense. Madrid. pp: 1-217.
  - Cerdán, S., Cascales, M., Chacón, P., Cascales, F. y Santos-Ruiz, A. (1-78) Arch. Toxicol. Suppl. 1: 221-224.
  - Cerdán, S., Cascales, M. y Santos-Ruiz, A. (1979) Arch. Toxicol. (en prensa).

- Chappell, J.B. (1968) *Britt. Med. Bull.* 24: 150-157.
- Chalvardjian, A. (1970) *Can. J. Biochem. Physiol.* 48: 1254.
- Christoffersen, P. y Nielsen, K. (1972) *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 80: 557.
- Clarck, M.G., Bloxham, D.P., Holland, P.C. y Lardy, H.A. (1974) *J. Biol. Chem.* 249: 279-290.
- Cleland, W.N. (1963) *Biochim. Biophys. Acta* 67: 104-137.
- Cohen, G. y Collins, M. (1970) *Science*, 167: 1749-1752.
- Cohen, G. (1973) en *Metabolismo Celular y su regulación*. pp. 50-72. Ed Omega.
- Cori, O. y Lipmann, F. (1952) *J. Biol. Chem.* 194: 417.
- Couri, D. y Racker, E. (1959) *Arch. Biochim. Biophys.* 83:195.
- Czok, R., Eckert, A. (1965) en *Methods in Enzymatic Analysis* (ed. Bergmeyer, H.U.) pp. 224-233.
- Dagley, S. (1974) en *Methoden der Enzymatischen Analyse* (ed. Bergmeyer, H.U.) pp. 1607-1611.
- Dann, L.G. y Britton, H.G. (1977) *Biochem. J.* 161: 445-448.
- Davis, E.J. y Lumeng, L. (1976) en *Use of isolated liver cells and kidney tubules in metabolic studies*. (eds. Tager, J.M., Söling, H.O. y Williamson, J.R.) pp. 112-117. North Holland Pub. Co. Amsterdam.
- Deitrich, R.A. (1966) *Biochem. Pharmacol.* 15: 1911.
- Deitrich, R.A. (1971) *Science* 173: 334.
- Delbrück, A., Schimasse, K.H., Bartsch, K. y Bücher, Th. (1959) *Biochem. Z.* 331: 297.
- Devenyi, P., Rutherford, J., Seremy, G., Olin, J.S. (1970) *Ann. J. Gastroenterol.* 54: 597.
- Dickens, F. (1936) *Nature*, 138: 1057.
- Dickens, F. (1938) *Biochem. J.* 32: 1645-1653.
- Dische, Z. (1938) *Naturwiss.* 26:252.
- Dunaway, G.A. y Weber, G. (1974a) *Arch. Biochem. Biophys.* 162: 629-637.
- Dunaway, G.A. y Weber, G. (1974b) *Arch. Biochem. Biophys.* 162:620.
- Edelman, I.S. e Ismail-Beigi, F. (1974) *Recent. Prog. Horm. Res.* 30: 235.



- Eger-Meufeldt, I., Teinzer, A., Weiss, L. y Wieland, O. (1965) Biochem. Biophys. Res. Commun. 19: 43-48.
- Eggleston, L.V. y Krebs, H.A. (1974) Biochem. J. 138: 425-435.
- Eigenbrodt, E. y Schoner, N. (1977) Hoppe-Seyler's Z. Physiol Chem. 358: 1033-1046.
- Engel, P.C. y Dalziel, K. (1967) Biochem. J. 105: 691.
- Engelhardt, W.A. (1974) Mol. Cell Biochem. 5: 25-33.
- England, P.J. y Randle, P.J. (1967) Biochem. J. 105: 907.
- Eriksson, C.J.P. (1973) Biochem. Pharmacol. 22: 2283.
- Eriksson, C.J.P., Marselos, M. y Koivula, T. (1975) Biochem. J. 152: 705.
- Feliú, J.E., Hue, L. y Hers, H.G. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. 73: 2762-2766.
- Fellenius, E., Nisbeth, U., Pilstrom, L. y Kiessling, K.U. (1973) Br. J. Nutr. 29: 307-316.
- Fitch, W.M., Hill, R. y Chaicoff, I.L. (1959) J. Biol. Chem. 234: 2811-2813.
- Flatt, J.P. (1970) J. Lipid. Res. II, 131-143.
- Fonseca-Wollheim, F.J., Bergmeyer, H.U. y Gutmann, I. (1974) en Methoden der Enzymatischen Analyse (ed. Bergmeyer, H.U.) pp. 1850-1853.
- Glock, G.E. y McLean, P. (1953) Biochem. J. 55: 400.
- Glock, G.E. y McLean, P. (1955) Biochem. J. 61: 390-396.
- Golberg, N.D., Haddox, M.K., Nicol, S.E., Acott, T.S., Zeilig, C.E. y Glass, D.G. (1975) en Developmental Biology; vol. 2 pp. 440-471. (eds McMahon, D. y Fox, C.F.) Benjamin Inc. Menlo Park.

- Gonzalez, C., Ureta, T., Sanchez, R. y Niemeyer, H. (1964) Biochem. Biophys. Res. Commun. 16: 347.
- Gonzalez, C., Ureta, T., Babul, J., Rabajilla, E. y Niemeyer, H. (1967) Biochemistry 6: 460.
- Gordon, E.R. (1973) J. Biol. Chem. 248: 8271.
- Gordon, E.R. (1977) Biochem. Pharmacol. 26: 1229-1234.
- Greenbaum, A.L., Gumaa, K.A. y McLean, P. (1971a) en Essays in Biochemistry 7: 39-86. (eds. Campbell, P.N. y Dickens, F.) Academic Press.
- Greenbaum, A.L., Gumaa, K.A. y McLean, P. (1971b) Arch. Biochem. Biophys. 143: 617-663.
- Grossbard, L. y Schimke, R.T. (1966) J. Biol. Chem. 241: 3546.
- Gumaa, K.A. y McLean, P. (1969) Biochem. J. 115: 1009.
- Gumaa, K.A. y McLean, P. (1971) Postgraduate Med. J. (June suppl, 1971) 403-406.
- Gumaa, K.A. y McLean, P. (1972) Febs Letters 27: 293-297.
- Gutmann, I. y Wahlefeld, A.W. (1974) en Methoden der Enzymatischen Analyse (ed. Bergmeyer, H.U.) pp. 1632-1636.
- Haines, D.S.M. (1966) Can. J. Biochem. 44: 55.
- Hansen, R., Pilks, S.J. y Krah, M.E. (1967) Endocrinology 81: 1397.
- Havre, P., Abrams, M.A., Corral, R.J.M., Yu, L.C., Szczepanik, P.F., Feldman, H.B., Klein, P., Kong, M.S., Margolis, M. y Landau, B.R. (1977) Arch. Biochem. Biophys. 182: 14-23.
- Hohorst, H.J., Kreutz, F.H. y Bücher, Th. (1959) Biochem. Z. 332:18
- Hohorst, H.J. (1963) en Methods in Enzymatic Analysis (ed: Bergmeyer, H.U.) pp. 266-270.
- Holten, D., Procsal, D. y Chang, H.L. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun. 68: 436-441.
- Holzer, H., Kreutz, F.H., Reim, M. y Hübener, H.J. (1956) Biochem. Z. 328: 252.
- Horecker, B.L. y Smyrniotis, P.Z. (1951) J. Biol. Chem. 193: 371-381.
- Horecker, B.L., Smyrniotis, P.Z. y Seegmiller, J.E. (1951) J. Biol. Chem. 193: 383.
- Horecker, B.L., Smyrniotis, P.Z. (1953) J. Am. Chem. Soc. 75: 2021.

- Horecker, J. L. (1953) *Brewers Digest* 28: 214.
- Howard, C.F. Jr., Lowenstein, J.M. (1964) *Biochim. Biophys. Acta* 84: 226
- Hyams, D.E., Sabesin, S.M., Greenberger, N.J. e Isselbacher, K.J. (1966) *Biochim. Biophys. Acta* 125: 166
- Imamura, K., Tanaka, T. (1972) *J. Biochem. Tokyo* 71: 1043-1051.
- Imamura, K., Taniuchi, K. y Tanaka, T. (1972) *J. Biochem. Tokyo* 72: 1001-1015.
- James, T.N. y Baer, E.S. (1967) *Amer. Heart J.* 74: 243
- Jansen, G.R., Zanetti, M.E. y Hutchison, C.F. (1968) *Biochem. J.* 106: 345
- Johnston, J.M., Florkin, M. y Stotz, H. (1969) *Comprehensive Biochemistry* 18: 1-18.
- Johnson, C.S., Vogtmann, L. y Deal, W. (1976) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 73: 391-395.
- Jones, A.L. y Armstrong, D.T. (1965) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 119: 1136
- Katz, J. y Rognstad, R. (1976) *Curr. Top. Cell Reg.* 10: 237-239.
- Katzen, H.M. y Schimke, R.T. (1965) *Proc. Natl. Acad. Sci. US* 54: 1218
- Kemp, R.G. (1971) *J. Biol. Chem.* 246: 245-252.
- Kiessling, K.H. (1968) *Acta Pharmacol. Toxicol.* 26: 245
- King, J. (1974) en *Methoden der Enzymatischen Analyse* (ed. Bergmeyer, H.U.) Verlag Chemie.
- Klingenberg, M. (1974) en *Methoden der Enzymatischen Analyse* (ed. Bergmeyer, H.U.) pp. 2094-2101.
- Kohl, E.A. y Cottam, G.L. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 484: 49-58.
- Koivula, T. y Koivusalo, M. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 397: 9
- Koivula, T. y Lindros, K.O. (1975) *Biochem. Pharmacol.* 24: 1937-1942.
- Kornacker, M.S. y Lowenstein, J.M. (1965) *Biochem. J.* 94: 209
- Kornacker, M.S. y Lowenstein, J.M. (1965) *Biochem. J.* 95: 823
- Krebs, H.A. (1967) *Adv. Enzyme Reg.* 5: 409-434. (ed. Weber, G) Pergamon Press.

- Krebs, H.A., Gascoyne, T. y Norton, B.M. (1967) *Biochem. J.* 102: 275.
- Krebs, H.A. y Veech, R.L. (1968) *Adv. Enzyme Reg.* 7: 397-413.
- Krebs, H.A. y Veech, R.L. (1969) en *The Energy Level and Metabolic Control in Mitochondria*. pp. 329. (eds. Papa, S., Tager, J.M. Quagliariello, E. y Slater, E.C.) Gari Adriatica Editrice.
- Krebs, H.A. (1972) en *Essays in Biochemistry* 8: 1-34. Acad. Press
- Krebs, H.A. (1974) *Mol. Cell Biochem.* 5: 79-82.
- Krebs, H.A., Cornell, N.W., Lund, P. y Hems, R. (1974) en *Regulation of hepatic Metabolism* pp. 726-753. (eds Lundquist, F y Tygstrup, N) Alfred Benson Symp. 6 Munksgaard Copenhagen.
- Kubowitz, F. y Ott, P. (1943) *Biochem. Z.* 314: 94.
- Lad, P.M., Wolfam, N.N. y Hammes, G.G. (1977) *Biochemistry* 16: 4802-4806.
- Lagunas, R., McLean, P. y Greenbaum, A.L. (1970) *Eur. J. Biochem.* 15: 179-190.
- Lang, G. y Michal, G. (1974) en *Methoden der Enzymatischen Analyse* (ed. Bergmeyer, H.U.) pp. 1283-1287.
- LaNoue, K.F., Bryla, J., Basset, D.J.P. (1974) *J. Biol. Chem.* 249: 7514-7521.
- Leback, W.K. (1971) *Leber Magen Darm* 1: 130-141.
- Lehnninger, A.G. (1951) *J. Biol. Chem.* 190: 345.
- Lehnninger, A.L. Sudduth, H.C. y Wise, J.B. (1960) *J. Biol. Chem.* 235: 2450
- Levy, H.R. (1979) *Adv. in Enzymology* (ed. A. Meister) 48: 97-192.
- Lieber, C.S. (1967) *Ann. Rev. Med.* 18: 35
- Lieber, C.S. (1968) *Adv. Intern. Med.* 14: 151-199.
- Lieber, C.S. y Schmid, R. (1961) *J. Clin. Invest.* 40: 394.
- Lieber, C.S. y De Carli, L.M. (1964) *Clin. Res.* 12: 274.
- Lieber, C.S. y De Carli, L.M. (1968) *J. Clin. Invest.* 47: 62a.
- Lieber, C.S. y Rubin, E. (1968) *Am. J. Med.* 44: 200-206.
- Lindros, K.O., Wihma, R. y Forsander, O.A. (1972) *Biochem. J.* 126: 945.
- Lippman, F. (1936) *Nature*, 138: 588.

- Ljungström, G., Hjelmqvist, G. y Engström, L. (1974) Biochim. Biophys. Acta 358: 289-298.
- Ljungström, G., Berglund, L. y Engström, L. (1976) Eur. J. Biochem. 68: 497-506.
- Llorente, P., Marco, R. y Sols, A. (1970) Eur. J. Biochem. 13: 45-54.
- Lombardi, P., Pani, P. y Schlunk, F.F. (1968) J. Lipid. Res. 9: 437.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951) J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- Lowry, O.H., Passoneau, J.V., Hasselberger, F.X. y Schulz, D.W. (1964) J. Biol. Chem. 239: 18
- Lundquist, F., Thieden, H. y Grunnet, N. (1971) en Metabolic Changes induced by ethanol p. 108 (ed. Martini, G.A. y Bode, Ch.) Springer Verlag.
- Majchrowicz, E., Percaw, B.L., Cole, W.M. y Gregory, D.H. (1967) Quart J. Stud. Alcohol, 28: 213
- Mansour, T.E. y Mansour, J.M. (1962) J. Biol. Chem. 237: 6294
- Mansour, T.E. (1963) J. Biol. Chem. 238: 2285-2292.
- Mansour, T.E., Wakid, N.W. y Sprouse, H.M. (1965) Biochem. Biophys. Res. Commun. 19: 721.
- Mansour, T.E. (1972) Current Top. Cell Reg. 5: 1-46.
- Marco, R., Carbonell, J. y Llorente, P. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 43: 126-132.
- Marie, J., Garreau, H. y Kahn, A. (1977) Febs Letters 78:91-94.
- Marjanen, L. (1972) Biochem. J. 127: 633.
- Martensen, T.M. y Mansour, T.E. (1976) Biochemistry 15:4973-4980.
- Mayer, P.A. y Felts, J.M. (1967) Biochem. J. 105: 18c.
- McFarlane, H. y Answorth, S. (1974) Biochem. J. 139: 499-508.
- McLean, P. y Brown, J. (1966) Biochem. J. 100: 793
- McLean, P., Brown, J., Walters, E. y Greenslade, K. (1967) Biochem. J. 105: 1301
- Meijer, A.J. y Van Dam, K. (1974) Biochim. Biophys. Acta 345: 213

- Meijer, A.J. Van Boerkoorn, G.M., Williamson, J.R. y Tager, J.H. (1975) *Biochem. J.* 150: 205-209.
- Mellamby, J. y Williamson, J.H. (1974) en *Methoden der Enzymatischen Analyse*. pp 1887-1890. (ed. Bergmeyer, H.U.)
- Michal, G. y Lang, G. (1974) en *Methoden der Enzymatischen Analyse*. pp. 1460-1463. (ed. Bergmeyer, H.U.).
- Negelein, E. y Haas, E. (1935) *Biochem. Z.* 282: 206-220.
- Newsholme, E.A. y Start, C. (1973) en *Regulation Metabolism*. p.283. (ed John Wiley y Sons) Londres.
- Nikkila, E.A. y Ojala, K. (1963) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 113: 814-817.
- Noltman, E.A. y Kuby, S.A. (1963) en *The enzymes* 7: 223-242. (eds. Boyer, P.D., Lardy, H.A. y Myrbäck) Academic Press.
- Olivercrona, T., Harnell, O., Johnson, O., Fex, G., Wallinger, L. y Sandgren, O. (1972) *Q. Jl. Stud. Alcohol* 33:1
- Olson, J.A. (1966) *Ann. Review Biochemistry* 35: 559
- Ontko, J.A. (1974) en *Alcohol and Aldehyde metabolizing Systems* pp 299-314. (eds Thurman, R.G., Yonetani, T., Williamson, J.R. y Chance, B.) Academic Press.
- Oratz, M. y Rothschild, M.A. (1975) en *Alcohol and abnormal Protein Synthesis*. pp 343-372. (eds Oratz, Rothschild y Schreiber) Pergamon Press.
- Orme-Johnson, W.H. y Ziegler, D.M. (1965) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 21: 78
- Papa, J., Tager, A., Francavilla, A. y Quagliariello, E. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 172: 20-29.
- Parmegiani, A. y Krebs, E.G. (1965) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 19: 89
- Parrilla, R., Ohkawa, K., Lindros, K.O., Zimmerman, U-J.P., Kabayashi, K. y Williamson, J.R. (1974) *J. Biol. Chem.* 249: 4926.
- Passoneau, J.V. y Lowry, O.H. (1962) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 7: 10-15.
- Passoneau, J.V. y Lowry, O.H. (1963) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 13: 372-379.
- Racker, E. (1974) *Mol. Cell Biochem.* 5: 17-23.
- Ramaiah, A. y Tejmani, G.A. (1970) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 39: 1149-1156.

- Rawat, A.K. (1973) en *Advances in Experimental Medicine and Biology*. vol. 33, p. 145. (ed. Gross, H.M.) Plenum press.
- Riou, J.P., Claus, T.H. y Pilakis, S.J. (1976) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 73: 591-599.
- Riou, J.P., Claus, T.H. y Pilakis, S.J. (1978) *J. Biol. Chem.* 253: 659-699.
- Robinson, D.S. (1970) en *Comprehensive Biochemistry* 18: 51-116.
- Rodriguez-Segade, S., Freire, M. y Carrion, A. (1978) *Biochem. J.* 170: 577-582.
- Rongstad, R. y Clark, D. (1974) *Arch. Biochim. Biophys.* 161: 638-646.
- Rose, I.A. y Rose, Z.B. (1969) *Comprehensive Biochemistry* 17: 93-161.
- Rubin, E. y Lieber, C.S. (1968) *New. Engl. J. Med.* 278: 869-876.
- Rubin, E. (1971) en *Metabolic Changes induced by alcohol* pp. 71-75. (eds Martini, G.A. y Bode, Ch.) Springer Verlag.
- Rubin, E. (1975) en *Alcohol and abnormal protein synthesis. Biochemical and Clinical* pp. 295-319. (eds Rothschild, M.A., Oratz, M. y Schreiber, S.S.) Pergamon Press.
- Salas, M., Viñuela E. y Sols, A. (1963) *J. Biol. Chem.* 238: 3535
- Santos-Ruiz, M.R. y Cascales, C. (1979) *Anales Real Academia Farmacia* (aceptado, en prensa).
- Sapag-Hagar, M., Marco, R. y Sols, A. (1969) *Febs Letters* 3: 68
- Sapag-Hagar, M., Lagunas, R. y Sols, A. (1973) *Biochem Biophys Res. Commun.* 50: 179-185.
- Sato, S., Matsushima, T., Sugimura, T. (1969) *Cancer Res.* 29:1437
- Scholtz, R., Hansen, W. y Thurman, R. (1973) *Eur. J. Biochem.* 38, 64-72.
- Scow, R.O. y Chernick, S.S. (1970) *Comprehensive Biochemistry* 18: 19-49.
- Scrutton, M. y Utter, M.F. (1968) *Ann. Rev. Biochem.* 37: 669
- Shapiro, B. (1967) *Ann. Rev. Biochem.* 36: 247
- Sharma, C., Manjeshwar, R. y Weinhouse, S. (1963) *J. Biol. Chem.* 238: 3840-3845.

- Sharma, C., Manjeshwar, R. y Weinhouse, S. (1964) *Advances in Enzyme Regulation* 2: 139
- Shatton, J.B., Morris, H.P. y Weinhouse, S. (1969) *Cancer Res.* 23: 1161.
- Sies, H., Summef, K.H., Haussinger, D. y Bücher, T. (1976) en *Use of isolated liver cells and kidney tubules in metabolic studies.* pp 311-316. (eds. Tager, Söling, y Williamson) North Holland Pub. Co. Amsterdam.
- Slein, M.W. (1965) en *Methods of enzymatic Analysis* (ed. Bergmeyer, H.U.) Academic Press.
- Smith, S.B., Briggs, S., Triebwasser, K.C. y Freedland, R.A. (1977) *Biochem. J.* 162: 453-455.
- Söling, H.O., Kleinske, J., Willms, B., Janson, G. y Kuhn, A. (1973) *Eur. J. Biochem.* 37: 233-243.
- Sols, A. (1976) en *Reflections on Biochemistry* pp. 199-206. (ed. Kornberg, A., Horecker, B.L. y Cornudella, L. Oró, J.)
- Sols, A., Salas, M. y Viñuela, E. (1964) *Adv. Enzyme Regulation* 2: 177-188.
- Stein, O. y Stein, Y. (1967) *J. Cell Biol.* 33:319
- Susor, W.A. y Rutter, W.J. (1968) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 30: 14-20.
- Tager, J.M., Papa, S., De Haan, E.J., D'Alaya, R. y Quagliariello, E. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 172: 7-19.
- Tauton, Q.D., Stifel, F.B., Greene, H.L. Herman, R.H. (1972) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 48: 1663-1670.
- Taylor, C.B., Bailey, E. y Bartley, W. (1967) *Biochem. J.* 105: 717
- Tepperman, J. y Tepperman, H.M. (1958) *Amer. J. Physiol.* 193: 55-64.
- Tepperman, H.M. y Tepperman, J. (1964) *Amer. J. Physiol.* 206: 357
- Theorell, J.H. y Chance, B. (1951) *Acta Chem. Scand.* 5:1127
- Thurman, R.G. y Scholtz, R. (1973) *Eur. J. Biochem.* 38:73-78.
- Tornheim, K. y Lowenstein, J.M. (1976) *J. Biol. Chem.* 251: 7322-7328.



- Tottmar, S.O.C., Fettersson, H. y Kiessling, K.H. (1974) en Alcohol and aldehyde metabolizing Systems. (ed. Thurman, Yonetani, Williamson y Chance) pp 147-160 Academic Press.
- Truitt, E.B. Jr. y Walsh, M.J. (1971) en The biology of alcoholism. 1: p. 161. (ed. Kissin, B. y Begleiter, H.) Plenum press.
- Trujillo, J.L. y Deal, W.C. (1977) Biochemistry 16: 3098-3104.
- Ugarte, G., Iturriaga, H. y Insunza, I. (1970) Progress in liver disease (ed. Grune y Stratton) Nueva York.
- Uyeda, K. (1979) Advances in Enzymol. 48: 194-224.
- Veech, R.L., Eggleston, L.V. y Krebs, H.A. (1969) Biochem. J. 115: 609-619
- Veech, R.L. y Krebs, H.A. (1969) en The energy level and metabolic control in mitochondria. P. 329 (eds. Tager, J.M. Quagliariello, E. y Slater, E.C.) Adriatica Editrice. Bari.
- Veech, R.L., Rajman, L. y Krebs, H.A. (1970) Biochem. J. 117: 499-503.
- Veech, R.L. (1974) en Alcohol and aldehyde metabolizing Systems. pp 383-394. (eds. Thurman, R.G., Yonetani, T., Williamson, J.R. y Chance, B.) Academic Press.
- Videla, L. e Israel, Y. (1970) Biochem. J. 118: 275
- Viñuela, E., Salas, M.L. y Sols, A. (1963) Biochim. Biophys. Res. Commun. 12:140
- Waldvogel, . y Slenk, . (1947) Arch. Biochem. Biophys. 14: 484
- Walker, D.G. (1962) Biochem. J. 84: 118p.
- Walker, D.G. (1963) Biochem. J. 88: 17p.
- Walsh, D.A., Krebs, E.G., Reinmann, E.M., Brostrom, M.A., Corbin, J.D., Hickenbottom, J.H., Soderling, T.R. y Perkins, J.P. (1970) en Advances in Biochemical psychopharmacology vol.3 pp. 265. (eds Greengard, P. y Costa, E.) Raven press.
- Warburg, O. y Christian, W. (1931) Biochem. Z. 242: 206-
- Warburg, O., Christian, W. y Griesse, A. (1935) Biochem. Z. 282: 157-198.
- Warburg, O. y Christian, W. (1936) Biochem. Z. 267: 440-

- Warburg, O. y Christian, W. (1937) Biochem. Z. 292: 237-
- Weber, G., Singhal, R.L. y Srivastava, S.K. (1965) Adv. Enz. Regulation 3: 43-75.
- Weber, G., Hird Convery, H.J., Lea, M.A. y Stamm, N.B. (1966) Science 154: 1357-1360.
- Weber, G. (1969) Adv. Enz. Regulation 7: 15-40.
- Wenzel, K.W., Kurganov, B.I., Zimmermann, G., Yakoulev, V.A., Schellenberger, W. y Hofman, E. (1976) Eur. J. Biochem. 61: 181-190.
- Weigl, K. y Sies, H. (1977) Eur. J. Biochem. 77, 401-408.
- Wicreat, A.F., Orishimo, M.W., Nelson, J. y Phillips, S.J. (1969) J. Biol. Chem. 244: 6498
- Williams, J.F. y Clark, M.G. (1971) Search 2: 80-88.
- Williamson, D.H., Mellamby, J. y Krebs, H.A. (1962) Biochem. J. 82: 90
- Williamson, J.R. y Kreisberg, R.A. Felts, P.W. (1966) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 56: 247
- Williamson, D.H., Lund, P. y Krebs, H.A. (1967) Biochem. J. 103: 514-527.
- Williamson, J.R., Jacob, A. y Refino, C. (1971) J. Biol. Chem. 246: 7632-7641.
- Williamson, J.R., Ohkawa, K. y Meijer, A.J. (1974) en Alcohol and aldehyde metabolizing systems. p 365-381. (eds. Thurman, Yonetani, Williamson y Chamce) Academic Press.
- Williamson, D.H. y Mellamby, J. (1974) en Methoden der enzymatischen Analyse pp. 1883-1886. (ed. Bergmeyer, H.U.) Verlag Chemie.
- Windmueller, H.G. y Spaeth, A.E. (1966) J. Biol. Chem. 241: 2891-2899.
- Wolfan, N.N. y Hames, G.G. (1977) Biochemistry, 16: 4806-4811.
- Wollemberger, A., Ristau, O. y Schoffa, F. (1960) Arch. Ges. Physiol. 270: 399
- Yokoama, A. y Zilversmit, D.B. (1965) J. Lipid Res. 6: 241

